



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

MAYARA MAGNA DE LIMA MELO

**ANÁLISE DOS GENES *CDC20* E *CEP55* NA PATOGÊNESE DA SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA E SUAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS**

FORTALEZA

2020

MAYARA MAGNA DE LIMA MELO

ANÁLISE DOS GENES *CDC20* E *CEP55* NA PATOGÊNESE DA SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA E SUAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestrado em Ciências Médicas.
Área de concentração: Medicina II

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M486a Melo, Mayara Magna de Lima.
Análise dos genes CDC20 e CEP55 na patogênese da Síndrome Mielodisplásica e suas alterações cromossômicas / Mayara Magna de Lima Melo. – 2020.
124 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.
1. Síndrome mielodisplásica. 2. alterações cromossômicas. 3. CDC20. 4. CEP55. I. Título.
- CDD 610
-

MAYARA MAGNA DE LIMA MELO

ANÁLISE DOS GENES *CDC20* E *CEP55* NA PATOGÊNESE DA SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA E SUAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestrado em Ciências Médicas.

Área de concentração: Medicina II

Aprovada em: 25/09/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz-Ceará.

Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo
Universidade Federal do Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter permitido que eu chegasse até aqui, por ter me sustentado em todos os momentos.

Aos meus pais **Marlucia de Lima Ferreira Melo e Antônio Magno Ferreira Melo**, pelo amor incondicional, pelo exemplo que sempre me deram de como ser uma pessoa íntegra e determinada, por sempre me darem apoio e me incentivarem a ir atrás dos meus sonhos. Nunca terei como agradecê-los o suficiente.

Aos meus avós e em especial minha querida vó, **Julieta de Lima e Silva** (*in memoriam*), quem eu tive a sorte de conviver, pelo seu amor incondicional, por ser uma referência de bondade, de força e de ser humano, hoje sei que és um ser de luz que me guia e me protege, agradecerei sempre por fazer parte do seu legado.

Aos meus irmãos, **Claudio Magno e Carlos Magno**, à todos os meus amigos, pelo apoio, carinho e amizade. E a toda minha família, meus primos, tios por todo o carinho.

Ao meu esposo **Carlos Del Prestes Monteiro Neto**, que esteve sempre ao meu lado durante toda essa trajetória e agradeço imensamente por ter encontrado esse parceiro maravilhoso.

Ao meu orientador, **Dr. Ronald Pinheiro**, por ter me dado a essa oportunidade de participar deste grupo, pelos conhecimentos compartilhados e pela confiança e pelo exemplo de profissional e pesquisador.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, **Profa. Silvia Magalhães, Prof. Antônio Lucena e Prof. Gilvan Pessoa** por terem aceitado o convite e pela atenção que sempre dispõem em ajudar e contribuir cientificamente com o trabalho. Muito obrigada por tudo.

À **Daniela Borges**, cuja participação foi essencial para a conclusão desse trabalho. Por sempre ajudar de coração, pelo apoio e pelo otimismo, pela parceria, essa caminhada não seria a mesma sem você, sem sua amizade, obrigada por tudo.

À **Roberta Taiane**, pela disponibilidade de sempre, pelo apoio, pela inspiração, tenho muita gratidão de poder partilhar com vocês esse amor pelo que fazemos e o orgulho por fazer parte desse grupo que você ajudou a construir, obrigada por tudo.

Aos meus amigos do dia a dia **Gabrielle Melo e João Victor Alves**, por todos os momentos diários, deixando nossa rotina mais leve e alegre, grata pelo apoio de sempre.

Aos meus amigos **Wesley, Gabriel e Caio**, pela parceria durante essa jornada que passamos juntos, pelos momentos que tive vocês ao meu lado e pela amizade e o carinho de vocês.

Um agradecimento especial a **Sharlene Monteiro**, que é um exemplo de profissional, que sempre esteve do meu lado e teve e tem um papel fundamental no meu trabalho, por me apoiar e me ajudar a ajudar as pessoas (pacientes) e a fazer o que eu amo, que é sagrado, que é o meu trabalho. Obrigada por essa amizade valiosa.

Ao Laboratório Citogenômica do Câncer (**Roberta, Dani, Izabelle, Marília, Cris, Howard, Manuela, Sharlene, Gabi, Gabriel, Wesley, Caio, Bruna, Larissa, Victor, Letícia, Vanessa, Breno, Thayres, Ramon e Gustavo**), por todos os momentos de companheirismo, brincadeiras, aprendizado, pelo carinho que recebo de todos, pelas palavras de apoio, tenho uma felicidade imensa em ter vocês fazendo parte da minha vida.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro a essa pesquisa.

*“Escolha um trabalho que você ame e
não terá que trabalhar um único dia em sua vida.”
(Confúcio)*

*“Um plano razoável executado hoje é melhor do que
um plano perfeito que sempre fica para a semana que vem.”
(George Patton)*

“Se você fizer só o que sabe, você não será nada além do que já é.”

RESUMO

A síndrome mielodisplásica (SMD) caracteriza-se por um grupo heterogêneo de doenças clonais da células progenitoras hematopoéticas que apresentam uma série de características biológicas distintas. A presença de uma alteração citogenética na SMD tem importância para o diagnóstico, prognóstico e orientação terapêutica. Genes envolvidos nos processo de transição de metáfase para anáfase e no reparo do DNA podem estar envolvidos na gênese das alterações cromossômicas de pacientes com Síndrome Mielodisplásica. O objetivo desse estudo é analisar os genes *CDC20* e *CEP55* em pacientes com diagnóstico de SMD, associando os achados com alterações citogenéticas, variáveis clínicas e laboratoriais de impacto prognóstico. Foi analisada, a partir da metodologia de PCR em tempo real (RT-qPCR), a expressão de 45 pacientes com SMD e 5 controles. Para o estudo citogenético foi realizado o exame de cariótipo de medula óssea com cultura de curta duração por Banda-G. Os pacientes com SMD apresentaram expressão aumentada dos genes *CDC20* e *CEP55* em comparação com indivíduos saudáveis ($p=0.000$ e $p=0.000$). Foi observada hiperexpressão de *CDC20* e *CEP55* em pacientes que apresentavam o cariótipo alterado e cariótipo aneuplóide quando comparados com os pacientes com cariótipo normal ($p=0.000$ e $p=0.001$; $p=0.013$ e $p=0.022$, respectivamente). Adicionalmente, em pacientes com presença de cariótipo com deleção (7q) e cariótipo complexo ($p=0.005$; $p=0.019$, respectivamente) houve hiperexpressão de *CEP55*, enquanto os pacientes com cariótipo alterado não complexo ($p=0.002$) e com deleção (5q) e sem del (5q) ($p=0.000$ e $p=0.005$) mostraram aumento da expressão de *CDC20* quando comparados com os pacientes com cariótipo normal. Em relação aos achados de medula óssea e sangue periférico, a expressão de *CEP55* e *CDC20* é significamente maior ($p=0.040$ e $p=0.005$) quanto a presença de dismegacariopoiese. Há aumento de expressão do gene *CDC20* em pacientes com Hemoglobina < 10 g/dL ($p=0.033$), sideroblastos em anel > 15% ($p=0.034$), assim como pacientes que fazem parte do subgrupo SMD-SA-DM ($p=0.025$). Pacientes com idade maior que 60 anos apresentaram aumento de expressão de *CEP55* ($p=0.026$). Em análise de correlação de Pearson, os genes *CDC20* e *CEP55* apresentaram moderada correlação positivamente ($r = 0,646$) com influência de 43% da expressão de um sobre o outro, sugerindo que esses genes podem trabalhar de maneira conjunta. Em uma análise de correlação de *CEP55* com genes da via de reparo de fita simples do DNA, (banco de dados do Laboratório de

Citogenômica do Câncer), detectaram-se moderadas correlações positivas com os genes *XPA*, *XPG* e *CSB* ($r=0,674$; $r=0,606$ e $r=0,647$, respectivamente). Em relação ao gene *CDC20* e genes da verificação do fuso mitótico, detectaram-se correlações positivas com os genes *TPX2*, *AURB* e *MAD2* ($r=0,560$; $r=0,652$ e $r=0,576$). O aumento de expressão de *CDC20* e *CEP55* mostrou-se particularmente associado às alterações cromossômicas em SMD.

Palavras-chave: Síndrome mielodisplásica, alterações cromossômicas, *CDC20*, *CEP55*.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndrome (MDS) is characterized by a heterogeneous group of clonal diseases of hematopoietic progenitor cells that present a series of distinct biological characteristics. The presence of a cytogenetic change in MDS is important for diagnosis, prognosis and therapeutic guidance. Genes involved in the process of transition from metaphase to anaphase and DNA repair may be involved in the genesis of chromosomal changes in patients with Myelodysplastic Syndrome. The aim of this study is to analyze the CDC20 and CEP55 genes in patients diagnosed with MDS, associating the findings with cytogenetic changes, clinical and laboratory variables of prognostic impact. The expression of 45 patients with MDS and 5 controls was analyzed using real-time PCR (RT-qPCR) methodology. For the cytogenetic study, a bone marrow karyotype examinant with short-term culture was performed by G-band. MDS patients showed increased expression of the CDC20 and CEP55 genes compared to healthy individuals ($p = 0.000$ and $p = 0.000$). Hyperexpression of CDC20 and CEP55 was observed in patients with abnormal karyotype and aneuploid karyotype when compared with patients with normal karyotype ($p = 0.000$ and $p = 0.001$; $p = 0.013$ and $p = 0.022$, respectively). Additionally, in patients with karyotype with deletion (7q) and complex karyotype ($p = 0.005$; $p = 0.019$) there was overexpression of CEP55, while patients with non-complex karyotype ($p=0.002$) and with deletion (5q) and without del (5q) ($p = 0.000$; $p = 0.005$) showed overexpressed CDC20 when compared to patients with normal karyotype. Regarding the findings of bone marrow and peripheral blood, the expression of CEP55 and CDC20 was significantly higher ($p = 0.040$ and $p = 0.005$) in patients with dysmegakaryopoiesis. There is increased expression of the CDC20 gene in patients with hemoglobin <10 g / dL ($p = 0.033$), ring sideroblasts $>15\%$ ($p = 0.034$), as well as patients who are part of the ARSA subgroup ($p = 0.025$) (WHO, 2008). Patients older than 60 years showed increased expression of CEP55 ($p = 0.026$). In Pearson's correlation analysis, the CDC20 and CEP55 genes showed moderate positive correlation ($r = 0.646$) with an influence of 43% of the expression of one on the other, suggesting that these genes work together. In a correlation analysis of CEP55 with genes in the single strand DNA repair pathway (database of the Cancer Cytogenomics Laboratory), high positive correlations were detected with the XPA, XPG and CSB genes ($r = 0.674$; $r = 0.606$ and $r = 0.647$, respectively). Regarding the CDC20 gene and mitotic spindle verification genes, high

positive correlations were detected with the TPX2, AURB and MAD2 genes ($r = 0.560$; $r = 0.652$ and $r = 0.576$). The increased expression of CDC20 and CEP55 are particularly associated with chromosomal changes in MDS.

Keywords: Myelodysplastic syndrome, chromosomal changes, CDC20, CEP55.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação prognóstica do IPSS-R de acordo com as categorias citogenéticas.....	21
Figura 2: Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R	21
Figura 3: Mecanismos de Patogênese da SMD.....	23
Figura 4: Representação esquemática das diferentes linhas estudadas e publicações realizadas pelo nosso grupo de pesquisa em SMD.	25
Figura 5: Regulação do ciclo celular.	30
Figura 6: Estruturas envolvidas na segregação cromossômica.	32
Figura 7: CDC20 e seu papel no avanço da fase de metáfase para anáfase.....	34
Figura 8: Controle da divisão celular pelas proteínas do SAC	37
Figura 9: Destinos diversos das células diante de distúrbio mitóticos.....	39
Figura 10: Representação gráfica do momento da redução do nível de ciclina B1 e o aumento de sinais pró-apoptóticos na corrida pela morte celular mitótica.	41
Figura 11: Estrutura da CEP55 e sua ligação com o complexo de proteínas ESCRT, ALIX e TSG101.	45
Figura 12: PLK1 é um gatilho para o início da abscisão pelo controle temporal do recrutamento do ESCRT via CEP55.	47
Figura 13: Representação dos eixos de interação CEP55-FOXM1-PLK1 e CEP55-PI3K-AKT	49
Figura 14: Vários destinos possíveis para as células poliplóides.....	56
Figura 15: O ciclo celular endomitótico do megacariócito.	59
Figura 16: Anormalidades morfológicas na linhagem megacariocítica.....	62
Figura 17: Representação da Metodologia de Citogenética por Banda-G	66
Figura 18: Exemplos de cariótipos analisados no estudo	74
Figura 19: Níveis de expressão gênica do CDC20 em indivíduos saudáveis e pacientes com SMD.	78
Figura 20: Níveis de expressão gênica do CDC20 frente a variável Dismegacariopoiese.	79
Figura 21: Níveis de expressão gênica do CDC20 em relação a variável Cariótipo normal e alterado.....	80
Figura 22: Níveis de expressão gênica do CDC20 frente ao Cariótipo com e sem deleção 5q.	81
Figura 23: Níveis de expressão gênica do CDC20 frente a Cariótipo normal, Cariótipo alterado com e sem aneuploidia.....	82
Figura 24: Níveis de expressão gênica do CDC20 frente à presença de cariótipo Complexo.	83
Figura 25: Níveis de expressão gênica do CDC20 em relação aos níveis de Hemoglobina.....	84
Figura 26: Níveis de expressão gênica do CDC20 frente aos subtipos ARSA e AREB.....	85
Figura 27: Níveis de expressão gênica do CDC20 em relação a presença e ausência de sideroblastos em anel.	86
Figura 28: Níveis de expressão gênica do CEP55 em relação a variável Grupo	87
Figura 29: Níveis de expressão gênica do CEP55 em relação à variável Idade	88
Figura 30: Níveis de expressão gênica do CEP55 frente à variável Cariótipo normal e alterado	89
Figura 31: Níveis de expressão gênica do CEP55 frente à cariótipo normal, cariótipo alterado com e sem aneuploidia	90
Figura 32: Níveis de expressão gênica do CEP55 frente a presença de Dismegacariopoiese ...	91
Figura 33: Níveis de expressão gênica do CEP55 frente a variável cariótipo com e sem deleção 7q.....	92
Figura 34: Níveis de expressão gênica do CEP55 frente a variável Cariótipo Complexo.....	93

Figura 35: Níveis de expressão gênica do CEP55 frente às variáveis cariótipo normal e alterado e classificação SMD-SA e SMD-EB.....	94
Figura 36: Níveis de expressão gênica do CDC20 relação aos tipos SMD-SA(ARSA) e SMD-EB (AREB) e presença de cariótipo alterado	95
Figura 37: Gráfico da correlação de Pearson entre a expressão gênica dos genes CDC20 e CEP55.	96
Figura 38: Resumo esquemático dos resultados encontrados.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da SMD seguindo os critérios estabelecidos da revisão da OMS em 2016.....	20
Tabela 2: Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR.....	68
Tabela 3: Frequência das variáveis clínicas dos pacientes.....	72
Tabela 4: Caracterização dos pacientes segundo a classificação da OMS 2016.....	73
Tabela 5: Caracterização da citogenética e impacto prognóstico.....	75
Tabela 6: Descrição clínica dos pacientes.....	76
Tabela 7: Teste de correlação de Pearson entre os genes CEP55 e CDC20 e genes do ciclo celular e da via de reparo do DNA.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANC: Contagem absoluta de neutrófilos

AR: Anemia refratária.

AREB I: Anemia refratária com excesso de blastos tipo 1.

AREB II: Anemia refratária com excesso de blastos tipo 2.

ARSA: Anemia refrataria com sideroblastos em anel.

ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutada*

AURKA: Aurora Kinase A

AURKB: Aurora Kinase B

BCL2: *B-cell lymphoma 2*

BRCA1: *Breast cancer type 1*

BRCA2: *Breast cancer type 1*

CDC20: *Cell division cycle protein 20 homolog*

cDNA: DNA complementar

CEP55 Centrosomal protein of 55 kDa

CSA: *Cockayne syndrome A*

CSB: *Cockayne syndrome B*

CTH: Células tronco hematopoiéticas

CDKN1A: *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*

Cq: *Quantification cycle*

CRDM: Citopenias refratárias com displasias em múltiplas linhagens.

CRDU: Citopenias refratarias com displasia em única linhagem.

dNTP: Desoxirribonucleotídeo trifosfato

FISH: Hibridização in situ por fluorescência

Hb: Hemoglobina

HUWC: Hospital Universitário Walter Cantídio

IPSS: *Index Prognostic Score System*

KCl: Cloreto de Potássio

LIG 4: DNA Ligase 4

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

MAD2: *Mitotic arrest deficient 2*

MO: Medula óssea

MS: *Mitotic Slippage*

mRNA: RNA mensageiro
OMS: Organização Mundial da Saúde
OR: Odds-Ratio
PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
POLH: DNA polymerase eta
POLI: DNA polymerase iota
POLK: DNA polymerase kappa
POLL: DNA polymerase lambda
POLN: DNA polymerase nu
POLQ: DNA polymerase theta
POLZ: DNA polymerase zeta
qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa
REF: Referência
REV1: DNA directed polymerase
REV3L: DNA directed polymerase zeta catalytic subunit
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
SBF: Soro Bovino Fetal
TNF- α : Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TP53: Tumor protein 53
TPX2: Targeting protein for Xklp2
UBC: Ubiquitina C
XRCC5: X-Ray Repair Cross Complementing 5
XRCC6: X-Ray Repair Cross Complementing 6
XPA: Xeroderma pigmentosum complementation group A
XPC: Xeroderma pigmentosum, complementation group C,
XPG: Xeroderma pigmentosum, complementation group G,
WPSS: WHO Classification-Based Prognostic Scoring System

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 A Síndrome Mielodisplásica	17
1.2 Controle e regulação do ciclo celular	28
1.3 Gene <i>CDC20</i> (proteína do ciclo de divisão celular 20)	33
1.4 Gene <i>CEP55</i> (proteína centrossomal 55)	43
1.5 Poliploidia	52
1.6 Megacariopoiese	58
2. OBJETIVOS	63
2.1 Objetivo Geral	63
2.2 Objetivos específicos	63
3. MATERIAIS E METÓDOS	64
3.1. Seleção de Amostras	64
3.2. Aspectos Éticos	64
3.3. Coleta de Amostras	64
3.4. Cariótipo por Banda G	65
3.5. Análise de Expressão do mRNA por RT-qPCR	66
3.6 Variáveis Analisadas	69
3.7. Análise Estatística	70
4. RESULTADOS	72
4.1 Caracterização da População	72
4.2 Análise de expressão gênica por qPCR	78
4.2.1 Análise da expressão do gene <i>CDC20</i>	78
4.2.1.1 Expressão do gene <i>CDC20</i> em pacientes com SMD e controles saudáveis	78
4.2.1.2 Expressão do gene <i>CDC20</i> em relação a variável dismegacariopoiese	79
4.2.1.3 Expressão do gene <i>CDC20</i> em relação a variável cariótipo normal e alterado	80
4.2.1.4 Expressão do gene <i>CDC20</i> em relação a cariótipo com e sem deleção 5q. 81	
4.2.1.5 Expressão do gene <i>CDC20</i> em relação ao cariótipo normal, cariótipo alterado com e sem aneuploidia	82
4.2.1.6 Expressão do gene <i>CDC20</i> em relação à presença de cariótipo complexo	83
4.2.1.7 Expressão do gene <i>CDC20</i> em relação aos níveis de hemoglobina	84
4.2.1.8 Expressão do gene <i>CDC20</i> em relação à classificação ARSA x AREB WHO (2008)	85

4.2.1.9	Expressão do gene <i>CDC20</i> em relação à presença de sideroblastos em anel.....	86
4.2.2	Análise da expressão do gene <i>CEP55</i>	87
4.2.2.1	Expressão do gene <i>CEP55</i> em relação à variável grupo.....	87
4.2.2.2	Expressão do gene <i>CEP55</i> em relação à variável idade.....	88
4.2.2.3	Expressão do gene <i>CEP55</i> em relação à cariótipo normal e alterado.....	89
4.2.2.4	Expressão do gene <i>CEP55</i> em relação ao cariótipo normal, cariótipo alterado com e sem aneuploidia	90
4.2.2.5	Expressão do gene <i>CEP55</i> em relação à dismegacariopoiese	91
4.2.2.6	Expressão do gene <i>CEP55</i> em relação à presença de cariótipo com deleção 7q.....	92
4.2.2.7	Expressão do gene <i>CEP55</i> em relação à presença de cariótipo complexo	93
4.2.2.8	Expressão do gene <i>CEP55</i> em relação aos tipos SMD-SA (ARSA) e SMD- EB (AREB) e presença de cariótipo alterado.....	94
4.2.2.9	Expressão gênica do <i>CDC20</i> em relação aos tipos SMD-SA (ARSA) e SMD-EB (AREB) e presença de cariótipo alterado	95
4.3	Análise de correlação entre os níveis de expressão dos genes <i>CDC20</i> e <i>CEP55</i>	96
4.4	Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes <i>CDC20</i> e <i>CEP55</i> com entre outros genes anteriormente estudados	96
5.	Representação esquemática dos resultados da análise de Expressão Gênica em pacientes com SMD	97
6.	DISCUSSÃO.....	98
7.	CONCLUSÃO	109
8.	REFERÊNCIAS	110

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Síndrome Mielodisplásica

A síndrome mielodisplásica (SMD) é uma das cinco principais categorias de neoplasias mielóides de acordo com o sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), atualizada em 2016 para cânceres hematológicos (ARBER *et al.*, 2016). O nome SMD é etimologicamente derivado do grego que significa anormalidade morfológica da medula óssea (GADJI; POZZO, 2019).

Como o próprio nome indica, a SMD não é uma entidade única, mas consiste em uma coleção de condições que, apesar de sua natureza heterogênea, são uniformemente caracterizadas por hematopoiese ineficaz, displasia morfológica na medula óssea e citopenias periféricas, instabilidade genética e aumento do risco de transformação em leucemia mielóide aguda (LMA) (RAZA *et al.*, 2010; RAZA; GALILI, 2012; WINTER *et al.*, 2020).

A SMD acomete mais frequentemente idosos com média de idade de 65 a 70 anos, ao diagnóstico. Cerca de 86% dos casos de SMD são diagnosticados com idade ≥ 60 anos e menos de 10% dos pacientes tem menos que 50 anos, assim, sua prevalência aumenta com a idade e está significativamente aumentada no sexo masculino (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; RAZA; ALI; IVERSON, 2014).

A SMD é uma das neoplasias hematológicas mais comuns nos países ocidentais, com uma incidência geral de de 3,5 a 12,6 novos casos a cada 100.000 indivíduos por ano, mas sua prevalência aumenta com a idade e esse número pode atingir 50 casos após os 70 anos (GADJI; POZZO, 2019). Nos EUA, os valores são de 3 a 4 indivíduos a cada 100 mil indivíduos e pode chegar até a 35 em indivíduos com 60 anos ou mais (GARCIA-MANERO; CHIEN; MONTALBAN-BRAVO, 2020). Assim, considerando a maior prevalência em pacientes idosos e o envelhecimento da população mundial, bem como maior conscientização diagnóstica, a incidência de SMD deve aumentar substancialmente nas próximas décadas (COREY *et al.*, 2007; WINTER *et al.*, 2020).

Em estudo Sul-Americano mais recente em que nosso grupo de pesquisa participou, envolvendo 1080 pacientes com diagnóstico de SMD primária do Brasil (345), Chile (100) e Argentina (635), foi observado que pacientes chilenos tinham uma menor média de idade com 59 anos ao diagnóstico, predomínio do sexo feminino e maior porcentagem de doentes classificados como de alto risco pelos escores prognósticos (IPSS e IPSS-R), o que lhes conferia menor sobrevida global em relação aos demais

grupos. Pacientes argentinos e brasileiros mostraram média de idade semelhante (66 anos e 65 anos, respectivamente) e diferente do primeiro país, houve em ambos predominância do sexo masculino e de pacientes em grupo de baixo risco (BELLI *et al.*, 2015).

A SMD é dividida em dois tipos de acordo com sua etiologia: primária (ou *de novo*), que não possui uma etiologia totalmente esclarecida e secundária (também denominada SMD relacionada à terapia), que ocorre após exposição a agentes genotóxicos, como quimioterapia ou radioterapia em tratamento a outras neoplasias. Aproximadamente 10% dos pacientes com SMD pertencem ao último grupo, no qual o prognóstico é geralmente pior em comparação aos casos *de novo* pois a resposta ao tratamento é baixa e a incidência de transformação em LMA é alta (MAGALHÃES *et al.*, 2018; RAZA; ALI; IVERSON, 2014).

Os fatores de risco da SMD primária incluem a exposição a benzeno ou outros solventes, exposições ocupacionais a pesticidas ou combustíveis, tabagismo e histórico familiar de neoplasias hematopoiéticas (GADJI; POZZO, 2019). Entretanto, segundo Raza et al. (2014), a análise dos referidos fatores e outras questões de estilo de vida, como consumo de álcool e obesidade, produziu resultados ambíguos em grandes metanálises, e nenhuma delas foi estabelecida como causa definitiva para SMD. Adicionalmente, a autora também chama a atenção para poucos estudos nesse escopo em pacientes com a doença.

Uma das características clínicas mais proeminentes da SMD, a presença de uma citopenia variável, seja anemia, neutropenia e/ou plaquetopenia, responde pelas principais complicações relacionadas aos pacientes com SMD, que comumente levam à necessidade de frequentes transfusões de hemocomponentes (BEJAR; STEENSMA, 2014; GREENBERG *et al.*, 2012a; RAZA *et al.*, 2010).

A anemia isolada é a apresentação clínica e laboratorial mais frequente (>90% dos casos), sendo macrocítica em 80% dos casos, normocítica ou, raramente, microcítica, geralmente levando à queixa de fadiga. Cerca de 60% dos casos apresentam outras citopenias associadas (neutropenia e/ou plaquetopenia) e, menos de 5% dos casos se apresentam com neutropenia ou plaquetopenia isoladas. A neutropenia leva a um aumento na susceptibilidade a infecções, sendo um importante fator associado a complicações fatais, enquanto a plaquetopenia está relacionada ao risco aumentado de sangramentos (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; GADJI; POZZO, 2019).

Os três "pilares" que sustentam o diagnóstico de SMD são: (1) citopenia persistente e clinicamente inexplicável ("sine qua non", um requisito absoluto); (2)

displasia morfológica significativa (>10%) seja na linhagem eritróide, granulocítica ou megacariocítica e (3) citogenética (e/ou evidência molecular de hematopoiese clonal que apesar de não requerida são informações complementares úteis) (HASSERJIAN, 2019). Os limiares recomendados estabelecidos para citopenias são: Hb <12 g/dL e <13 g/dL (para mulheres e homens, respectivamente), contagem de plaquetas <150.000/ μ L e contagem de neutrófilos <1800/ μ l (GREENBERG *et al.*, 2016). Quanto à displasia, recomenda-se a presença de \geq 10% em pelo menos uma linhagem mielóide (ARBER *et al.*, 2016; CHAMSEDDINE *et al.*, 2016; HASSERJIAN, 2019; PERAZZIO; CHAUFFAILLE, 2019).

O cariótipo deve ser realizado em todos os casos de SMD ao diagnóstico e tem um papel na classificação e prognóstico dos subtipos. Anormalidades citogenéticas recorrentes estão presentes em 40% a 60% dos casos primários (HASSERJIAN, 2019; PERAZZIO; CHAUFFAILLE, 2019) e em até 95 % dos casos secundários à rádio/quimioterapia, apresentando anormalidades associadas a doenças de alto risco, como cariótipos complexos, monossomia 5 ou deleções do cromossomo 7 (RAZA; ALI; IVERSON, 2014).

Em contraste com a LMA, em que anormalidades equilibradas, como translocações, são predominantes, a maioria das anormalidades na SMD são alterações desequilibradas, que resultam em ganhos ou perdas de materiais cromossômicos. Os mais frequentes entre estes são -7/del(7q) e -5/del(5q), seguidos por +8, dup(1q), del(20q), del(11q), del(12p), del(17p)/iso(17q), del(18q), ganhos como +21q, del(13q) e +der(1;7)(q10;p10). Muitas dessas lesões geralmente ocorrem como parte de anormalidades complexas, designadas como cariótipo complexo (CC), envolvendo múltiplos (\geq 3) cromossomos ou braços/segmentos cromossômicos (OGAWA, 2019).

No ano de 2016, foi publicada uma nova classificação de neoplasias mielóides da Organização Mundial de Saúde (OMS) (ARBER *et al.*, 2016). Esta edição incluiu informações aprimoradas de diagnóstico para muitos dos subtipos de SMD frente à classificação da OMS de 2008 (4ª edição), além de alguma reorganização das categorias de doenças. As nomenclaturas foram redefinidas como: SMD com Displasia em Única Linhagem (SMD-DU) e em múltiplas linhagens (SMD-CRDM), SMD com Sideroblastos em Anel em única linhagem (SMD-SA-DU) e múltiplas linhagens (SMD-SA-DM), SMD com excesso de blastos 1 e 2 (SMD-EB 1 e 2), SMD inclassificável e SMD com del5q isolada (Tabela 1) (HASSERJIAN, 2019).

Tabela 1: Classificação da SMD seguindo os critérios estabelecidos da revisão da OMS em 2016.

SUBTIPO DE SMD	SANGUE PERIFÉRICO	MEDULA ÓSSEA
SMD-DU	≤1% de blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; 5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD-DM	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; 5% de Sideroblastos em anel*; ≤5% de blastos
<u>SMD com Sideroblastos em Anel (SMD-SA)</u>		
SMD-SA-DU	≤1 % de blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD-SA-DM	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
<u>SMD com Excesso de Blastos (SMD-EB)</u>		
SMD-EB1	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 2 a 4% de blastos	Displasia em 0,1,2 ou 3 linhagens; 5 a 9% de blastos
SMD-EB2	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 5 a 19% de blastos	Displasia em 0,1,2 ou 3 linhagens; 10 a 19% de blastos
<u>SMD inclassificável (SMD-i)</u>		
SMD-i com 1% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1%× de blastos	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos
SMD-i com displasia em única linhagem e pancitopenia	Citopenia em 3 linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 1 linhagem; 5% de blastos
SMD-i baseada em alterações citogenéticas	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Ausência de displasias; ≤15% de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
SMD com del(5q) isolada	≤1% de blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos; del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional, exceto del(7q)-7

*Condição na presença da mutação do gene SF3B1; ×1% de blastos deve ser encontrado em pelo menos duas situações isoladas.

Fonte: Adaptado de Arber et al (2016)

Além da classificação criada pela a OMS, o IPSS (Sistema Internacional de Classificação de Prognóstico) foi desenvolvido por Greenberg e colaboradores em 1997 e revisado em 2012, como um sistema de classificação baseado em escores prognósticos a partir de pacientes com SMD primária. Um método, que utiliza a citogenética, características morfológicas e clínicas para determinar o prognóstico, que estratifica os pacientes em cinco grupos de risco (risco muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto) para transformação em LMA, além de estimar a sobrevida do paciente (Figuras 1 e 2) (GREENBERG *et al.*, 2012).

Figura 1. Classificação prognóstica do IPSS-R de acordo com as categorias citogenéticas

Muito Favorável	Favorável	Intermediário	Desfavorável	Muito Desfavorável
<ul style="list-style-type: none"> Única: del(11q)-Y 	<ul style="list-style-type: none"> Normal Única: del(5q) del(12p) del(20p) Dupla: Incl. del(5q) 	<ul style="list-style-type: none"> Única: del(7q)+8 i(17q)+19 Qualquer outra Dupla: Qualquer outra 	<ul style="list-style-type: none"> Única: del(3q)-7 Dupla: Incl. -7/7q- Complexo: 3 alterações 	<ul style="list-style-type: none"> Complexo: > 3 alterações

Fonte: Adaptado de Greenberg et al (2012)

Figura 2: Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R

VARIÁVEIS	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cariótipo	Muito Favorável		Favorável		Intermediário	Desfavorável	Muito Desfavorável
Blastos MO (%)	≤2		>2 a <5		5 a 10	>10	
Hb (g/dL)	≥10		8 a <10	<8			
ANC (mm ³)	≥800		<800				
Plaquetas (mil cél/mm ³)	≥100	50 a <100	≤50				

CATEGORIA DE RISCO					
	Muito Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Muito Alto
Escore	≤1,5	>1,5- 3	>3-4,5	>4,5-6	>6
Sobrevida (anos)	8,8	5,3	3	1,6	0,8

Legenda: Hb = Hemoglobina; ANC = Contagem absoluta de neutrófilos; MO = Medula óssea.

Fonte: Adaptado de Greenberg et al (2012)

Os pacientes com SMD são, dessa forma, divididos naqueles com alto risco de transformação em LMA versus aqueles com baixo risco, estes últimos, quando fatais ocorrem por uma evolução de citopenias (RAZA *et al.*, 2010). Essa transformação ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes (ADÈS; ITZYKSON; FENAUX, 2014; BEJAR; STEENSMA, 2014). Os primeiros têm a mesma incidência de apoptose nas células em maturação que pacientes de baixo risco, entretanto, as células imaturas dos pacientes de alto risco são resistentes à apoptose e são responsáveis pela menor incidência geral de apoptose nesse grupo (RAZA *et al.*, 2010).

Segundo Raza *et al.* (2010), as manifestações clínicas da SMD decorrem de alterações da célula, chamada pelos autores de “semente” e de seu microambiente, chamado de “solo”.

Assim, a apoptose foi a primeira característica biológica presente em todos os subtipos de SMD (RAZA; GALILI, 2012a). Esse fenômeno é governado por duas vias interligadas que levam à morte celular: (1) A via extrínseca que é ativada em resposta a proteínas de sinalização externas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e FAS-L, que por sua vez, geram sinais que levam à ativação de caspases. (2) A via intrínseca que é fortemente regulada pela superfamília BCL-2 de proteínas. A interação complexa entre vários membros dessa família culmina na liberação do citocromo-C das mitocôndrias que ao final também induz a ativação de caspases (MCBRIDE *et al.*, 2019).

Dessa forma, enquanto na SMD a apoptose é parcialmente mediada por citocinas pró-inflamatórias, as próprias células clonais também manifestam a tendência de apoptose independente do “solo” (microambiente) anormal. Assim, fatores parácrinos e autócrinos contribuem para a apoptose excessiva na doença e conseqüente citopenia. O excesso de apoptose e potencial de diferenciação (com conseqüente aumento de blastos) são perdidos à medida em que a doença progride para LMA (GADJI; POZZO, 2019; RAZA; GALILI, 2012a).

Uma única mutação em apenas um conjunto de genes pode dotar a uma única célula-tronco uma vantagem competitiva sobre as células vizinhas e impulsionar a expansão clonal (LINDSLEY, 2017). A capacidade de auto-renovação deve estar presente na célula que inicia a SMD. Essa célula pode surgir de uma CTH auto-renovável ou pode vir de um progenitor mielóide mais diferenciado que adquire a capacidade de se auto-renovar. Uma expansão clonal adicional pode ocorrer por meio do aumento da proliferação ou resistência à apoptose e um microambiente anormal da medula óssea pode

favorecer o desenvolvimento de um clone neoplásico (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011a; SALLMAN; LIST, 2019; WINTER *et al.*, 2020).

Segundo Bejar; Levine & Ebert (2011), as etapas associadas à patogênese da SMD incluem (1) auto-renovação aprimorada de uma célula-tronco hematopoiética ou aquisição de auto-renovação em uma célula progenitora, (2) aumento da capacidade proliferativa no clone neoplásico e/ou em sua progenitora mais diferenciada, (3) diferenciação prejudicada ou bloqueada, (4) instabilidade genética e epigenética, (5) mecanismos antiapoptóticos na manutenção da doença (6) evasão do sistema imunológico e (7) supressão da hematopoiese normal (Figura 3).

Mais recentemente, um outro modelo foi proposto por Chamseddine *et al.* (2016) para a patogênese de SMD que inclui (1) Dano ao DNA e alterações epigenéticas após exposição inflamatórias, de agentes genotóxicos ou disfunção dos telômeros. (2) Na SMD de baixo grau, os pontos de verificação de danos ao DNA das células serão ativados, interrompendo o ciclo celular, desencadeando a morte celular programada. (3) A secreção desequilibrada de citocinas e o aumento da expressão de TNF- α e Fas na superfície das CTHs aumentarão sua apoptose. (4) Na SMD de alto grau, a resistência aos pontos de verificação de danos ao DNA têm um risco aumentado de adquirir mutações genéticas/epigenéticas adicionais que levarão a um crescimento clonal seletivo. Neste cenário, essas alterações proporcionam uma vantagem de sobrevivência ao clone neoplásico, aumentando conseqüentemente a risco de progressão para LMA.

Figura 3: Mecanismos de Patogênese da SMD



Legenda: As etapas associadas à patogênese da SMD a medida em que há o avanço da doença.

Fonte: Adaptado de Bejar et al (2011); Chamseddine et al. (2016).

A patogênese da SMD é o reflexo da heterogeneidade da doença, engloba múltiplos passos, mecanismos e fatores que podem ser endógenos e/ou exógenos. O clone anormal e geneticamente instável de células hematopoiéticas se desenvolve após sofrer diversas alterações genéticas, citogenéticas e epigenéticas, sob um microambiente desregulado gerando mudanças funcionais nas células, e, conseqüentemente, o estabelecimento e/ou evolução da doença (VASSALO e MAGALHAES, 2009).

Nesse contexto, há alguns anos nosso grupo tem concentrado esforços no estudo da patogênese de SMD, processo este que está distante de ser totalmente elucidado. Duas linhas de pesquisa estudadas merecem destaque: os genes envolvidos na via de reparo do DNA (*ATM, RAD51, LIG 4, BRCA1, BRCA2, XRCC5, XRCC6, XPA, XPC, XPG, CSA e CSB* e polimerases com atividade de translesão, *REV3L, REV1, POLI, POLH, POLL, POLK, POLQ, POLN e PCNA*) (DE OLIVEIRA, R.T.G., 2018; JUNIOR *et al.*, 2019; RIBEIRO, H. L. *et al.*, 2017; RIBEIRO, H. L. *et al.*, 2018, 2015; SANTIAGO *et al.*, 2017) e a análise da expressão gênica e proteica da via do ciclo celular (*AURKA, AURKB, MAD2, TPX2, CDKN1A, CDC20*) (BORGES *et al.*, 2018; GENGA *et al.*, 2015; HEREDIA, F. F. *et al.*, 2012; HEREDIA, F F *et al.*, 2014).

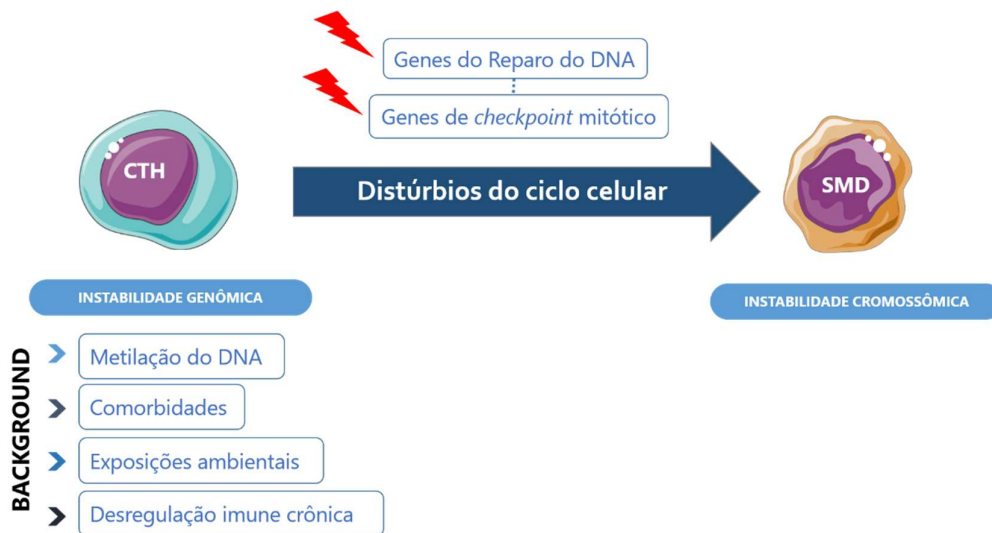
Outra área de estudo que vem ganhando destaque nos últimos anos são os mecanismos relacionados ao sistema imune (BARREYRO; CHLON; STARCZYNOWSKI, 2018; SALLMAN; LIST, 2019; WINTER *et al.*, 2020). Nesse escopo, mais recentemente, estudamos a expressão do gene *TLR3* (*Toll like receptor 3*), e de retrovirus endógenos *ERV3-1, ERVK6 e ERVW1* (VITORIANO, 2019). Além da análise das proteínas pró-inflamatórias, IL-8 e NFκβ (DE MATOS *et al.*, 2017; OKUBO *et al.*, 2017), também estudamos extensivamente a via dos Interferons (*IRF1 a IRF9*) e metilação dos mesmos (PINHEIRO *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2019; VITORIANO, 2019).

Em 2020, nosso grupo participou de um estudo em contribuição com 24 centros de pesquisa no mundo atingindo um total de 3.324 casos de SMD. Neste estudo foram analisadas as conseqüências, inéditas até então, dos tipos de mutações no gene *TP53*, apresentando informações valiosas para futuras estratificações do IPSS-R e estudos de terapia-alvo ou de resposta ao tratamento (BERNARD *et al.*, 2020). Também realizamos, recentemente, o estudo da metilação global do DNA em biópsias de pacientes com SMD (CAVALCANTE, 2020).

Outras abordagens merecem atenção como a de comorbidades em pacientes com SMD (AGUIAR *et al.*, 2019; MENDONÇA; PINHEIRO; MAGALHÃES, 2019) e

estudos com indivíduos em exposição a agrotóxico (Figura 4) (COSTA, 2017; FARIAS, 2017; FERREIRA FILHO, 2013; FRANÇA, 2020).

Figura 4: Representação esquemática das diferentes linhas estudadas e publicações realizadas pelo nosso grupo de pesquisa em SMD.



Legenda: Os diversos estudos do nosso grupo de pesquisa em SMD que investigam vias associadas ao processo multifatorial e “multi-step” da patogênese da doença, as linhas vão desde o estudo de um *background* epigenético, de comorbidades, de exposições ambientais e desregulação imune crônica. Além disso, temos estudado extensamente as vias de reparo do DNA e genes de *checkpoint* mitótico e do fuso mitótico.

Fonte: O próprio autor.

Um cenário complexo e dinâmico de mutações genéticas é comum na SMD. Avanços recentes no sequenciamento *next generation* (NGS) ajudaram a identificar mutações *drivers* (i.e, “condutoras”, definidas com base em estudos publicados que descrevem um excesso estatisticamente significativo de mutações somáticas em um determinado gene do câncer) (PAPAEMMANUIL et al., 2013). As principais vias envolvidas são as de *Splicing* de RNA (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*), metilação de DNA (*TET2*, *DNMT3A* e *IDH1/IDH2*), modificação de histonas/cromatina (*EZH2* e *ASXL1*), sinalização (*JAK2*, *FLT3* e *NRAS*), transcrição (*RUNX1*, *ETV6*, *GATA*), *checkpoint*/Ciclo celular (*TP53* e *CDKN2A*), reparo de DNA (*ATM* e *BRCC3*) (BEJAR et al., 2011; NAKAJIMA, 2020; OGAWA, 2019; PAPAEMMANUIL et al., 2013; RAZA; ALI; IVERSON, 2014; SALLMAN; LIST, 2019; WINTER et al., 2020).

Dessa forma, algumas mutações parecem ser fatores determinantes para o estabelecimento da SMD (em eventos iniciais), assim como, podem alterar as características biológicas e o fenótipo da doença de maneira única, como por exemplo, a mutação *SF3B1* incluída na revisão da OMS de 2016 como uma alteração que identifica uma condição caracterizada por sideroblastos em anel (ARBER *et al.*, 2016; DONAIRES *et al.*, 2016, p. 1; MALCOVATI *et al.*, 2015; MALCOVATI *et al.*, 2020).

A integração da avaliação de mutações na classificação diagnóstica e nos sistemas de pontuação prognóstica parecem ser inevitáveis. Essa infomação tem grande potencial de analisar diversas formas da doenças com clínica previsível, mas, muitas vezes, bastante variável, mesmo entre pacientes considerados com o mesmo subtipo, refletindo também heterogeneidade da doença (BEJAR *et al.*, 2011a; WINTER *et al.*, 2020).

Combinado com anormalidades cromossômicas, mais de 90% dos pacientes com SMD apresentam uma ou mais alterações genéticas recorrentes. Entre estes, os mais frequentemente observados são aqueles que afetam a regulação epigenética e o *splicing* de RNA (ALESHIN; GREENBERG, 2018; OGAWA, 2019; PAPAEMMANUIL *et al.*, 2013; RAZA; GALILI, 2012). As frequências das mutações são significativamente diferentes entre SMD e LMA primária; há uma importante representação de mutações nos genes da via dos receptores de tirosina-quinase (*FLT3 e KIT*) e RAS, bem como mutações *CEBPA e IDH/IDH2* na LMA, enquanto mutações nos fatores de *Splicing* e reguladores epigenéticos são mais prevalentes na SMD (OGAWA, 2019).

O gene *TP53* é um protótipo de gene supressor de tumor e está envolvido criticamente na regulação da resposta ao dano do DNA e ativação de oncogenes. É o gene mais frequentemente alterado no câncer humano, com aproximadamente 50% dos tumores portadores de deleções ou mutações (BERNARD *et al.*, 2020; BOETTCHER, S; EBERT, B. L., 2020).

As mutações no *TP53* são encontradas em aproximadamente um quarto da SMDs (BEJAR *et al.*, 2011b; OGAWA, 2019) e estão associadas a características clínicas de maior risco, como citopenias mais graves (especialmente trombocitopenia), aumento da contagem de blastos na MO, maior risco de transformação da LMA e menor sobrevida global (BEJAR *et al.*, 2011b; BERNARD *et al.*, 2020; BOETTCHER, S; EBERT, B. L., 2020).

Essas mutações são especialmente comuns na SMD relacionada à terapia, onde 50% dos casos têm mutações nesse gene. Além disso, essa alteração está fortemente correlacionada com a presença de cariótipo complexo (CC) (BEJAR *et al.*, 2011b). A

maioria dos pacientes com mutação *TP53* (cerca de 90%) exibem CC (OGAWA, 2019), especialmente aqueles com lesão bialélica de *TP53* (BEJAR *et al.*, 2011b; BERNARD *et al.*, 2020; OGAWA, 2019; BOETTCHER, S; EBERT, B. L., 2020).

Pacientes com *TP53* mutante e um cariótipo complexo apresentam uma escassez de mutações em outros genes (BEJAR *et al.*, 2011b; BOETTCHER, S; EBERT, B. L., 2020), sugerindo que esse grupo poderia ser considerado como tendo uma subclasse molecular distinta de outras formas da doença e com um mecanismo patogênico exclusivo (BEJAR *et al.*, 2011b).

Outro ponto interessante é que as células portadoras de mutações como *TET2* e *TP53* podem ser relativamente resistentes ao estresse inflamatório (por exemplo, pela ativação prejudicada do ponto de verificação do ciclo celular) e obter vantagem competitiva. Ao mesmo tempo, as taxas de mutação podem ser aumentadas pela inflamação local, facilitando a transformação maligna (RAAIJMAKERS, 2020).

Os avanços na terapia podem ser essencialmente medidos usando dois parâmetros: introdução de um novo agente que beneficia um número maior de pacientes em relação aos tratamentos predominantes ou ao uso mais seletivo de um medicamento existente, combinando-o com as características biológicas associadas à resposta (SCHECTER; GALILI; RAZA, 2012).

Assim, os pacientes com SMD podem ser separados em dois grandes grupos, com objetivos do tratamento completamente diferentes. Em pacientes de baixo risco, o tratamento geralmente é focado na possível melhora das citopenias, com medidas de apoio para a manutenção e melhoria da qualidade de vida. Nos pacientes de alto risco, o objetivo do tratamento é melhorar a citopenias e atrasar uma possível progressão leucêmica (SCALZULLI *et al.*, 2020).

Grande parte da dificuldade no tratamento desses pacientes está relacionada à sua heterogeneidade biológica, com pacientes apresentando perfis mutacionais e citogenéticos distintos. Durante a última década, grandes avanços ocorreram na caracterização molecular de SMD. Estudos revelam o tipo e a incidência de mutações somáticas que contribuem para as vias de sinalização disfuncional nas SMDs, bem como sua associação com o prognóstico da doença e a capacidade de resposta a determinados medicamentos (ALESHIN; GREENBERG, 2018). Assim, diante da complexidade dessa doença, a descoberta de uma única droga completa e infalível parece ser, cada vez mais, improvável.

Embora em 2020 uma nova droga chamada Luspatercept (PLATZBECKER *et al.*, 2017) tenha sido aprovada pelo FDA (Federal Drug Administration) para o tratamento de SMD, houve um longo período sem novidades terapêuticas, de modo que a última aprovação ocorreu apenas em 2006 com a decitabina (FELD; BELASEN; NAVADA, 2020). Atualmente, um arsenal de agentes biospecíficos direcionados à diversos mecanismos patogênicos da doença estão sendo avaliados em ensaios clínicos (ALESHIN; GREENBERG, 2018; FELD; BELASEN; NAVADA, 2020; SCALZULLI *et al.*, 2020). Até o ano de 2019, apenas três drogas eram aprovadas pela federação supracitada: os agentes hipometilantes, azacitidina e decitabina, que têm taxas de resposta de 40% para pacientes de alto risco e a lenalidomida que tem uma taxa de resposta de 60% a 70% para pacientes com del (5q) e 20% a 30% para pacientes sem del(5q) (ALESHIN; GREENBERG, 2018).

Mais recentemente, alguns alvos terapêuticos têm ganhado destaque diante dos resultados promissores em SMD, alguns, particularmente, após falha ou em associação com hipometilantes. É possível citar alguns exemplos como (1) Venetoclax, um inibidor de BCL-2, proteína anti-apoptótica, já aprovado para LMA (BALL *et al.*, 2020); (2) Rigosertib, um inibidor multiquinase, se liga ao domínio Ras de quinases como RAF e PI3K (NAVADA *et al.*, 2020); (3) Nivolumab e “similares”, com foco nas vias de escape imune, inibindo o axis PD-1/PD-L1/CTLA-4 (RAVANDI *et al.*, 2019); (4) APR-246, uma nova molécula que induz seletivamente apoptose via p53 em células cancerígenas por meio da reativação da proteína p53 mutante, restaurando a conformação do tipo selvagem (SALLMAN, 2020; SALLMAN, 2018); e finalmente, o já mencionado (5) Luspatercept, inibidor de TGF- β , diferente dos anteriores, usado em pacientes de baixo grau, parece restaurar a eritropoiese desses pacientes (FENAUX *et al.*, 2020; KOMROKJI, 2020).

1.2 Controle e regulação do ciclo celular

Os sinais regulatórios que controlam a divisão celular são coletivamente chamados de ciclo celular. Um processo de alta demanda de energia e que requer uma série de eventos ordenados para garantir a separação precisa das cromátides irmãs após a conclusão da replicação do DNA, a fim de manter a estabilidade do genoma. As células devem garantir a transmissão fiel de suas informações genéticas por várias gerações. (BIZARD; HICKSON, 2018; BOWER *et al.*, 2017; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013). Três

eventos importantes garantem esse processo de manutenção: a duplicação precisa do DNA, o reparo apropriado dos danos no DNA e a distribuição igual dos genomas recém-replicados para cada célula filha (BIZARD; HICKSON, 2018).

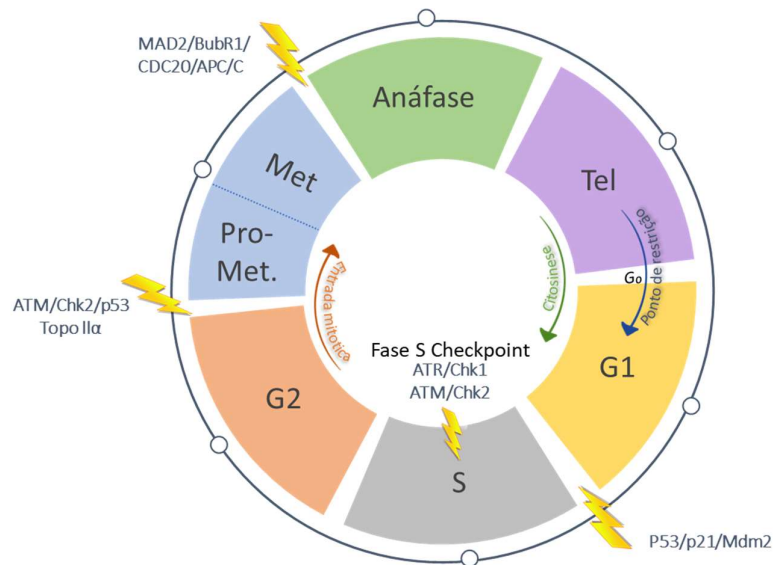
O ciclo celular é composto por cinco fases sequenciais distintas: quiescência (fase G0), Gap 1 (G1), replicação/síntese de DNA (S), Gap 2 (G2) e mitose (M). Ao final do ciclo, as células podem retornar à quiescência a partir do estado de repouso G0 ou, se estiverem proliferando, entrar novamente na primeira fase de gap (G1) após concluir a citocinese. Assim, a progressão no ciclo celular requer a orquestração precisa de uma sequência de eventos (BOWER *et al.*, 2017; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013; TORMOS; TALÉNS-VISCONTI; SASTRE, 2015).

O processo de divisão celular e o próprio genoma são rotineiramente ameaçados por insultos endógenos e exógenos. Por exemplo, espécies reativas de oxigênio, inflamações ou radiações ionizantes, podem danificar o DNA e perturbar a replicação e segregação dos cromossomos (VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECO, 2016). Assim, existem pausas na progressão do ciclo celular que são conhecidas como pontos de verificação (ou *checkpoints*), que mantêm a sequência precisa dos eventos. Esses pontos impedem a transição para a próxima fase até que a anterior seja totalmente concluída. O objetivo final é garantir que a célula detecte e repare o DNA danificado, se o dano for muito grave para reparar, a célula poderá entrar em senescência ou ativar cascatas de sinalização apoptóticas para impedir a transmissão do DNA danificado para as células filhas (BOWER *et al.*, 2017; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013).

Pelo menos quatro pontos de verificação do ciclo celular podem estar desregulados em células cancerígenas: (1) o ponto de restrição (G0/G1), (2) o ponto de verificação G1, (3) o ponto de verificação G2 e o (4) ponto de verificação de montagem do fuso (SAC) associado à saída da mitose (Figura 5) (BOWER *et al.*, 2017).

O ponto de verificação de danos no DNA em G1 atrasa o início da replicação do DNA na presença de danos e é amplamente controlado pela via p53/p21/Mdm2. A perda desse ponto de verificação geralmente pode ocorrer por meio de mutações TP53 ou inativação de p53 e levar à síntese de DNA propenso a erros devido à quantidade reduzida de tempo para reparo do DNA (BOWER *et al.*, 2017).

Figura 5: Regulação do ciclo celular.



Legenda: As fases do ciclo celular são mostradas dentro do círculo: G0, G1, G2 e Mitose, que consiste em várias sub-fases: prófase (Pro), metáfase (Met), anáfase e telófase (Tel). O ponto de restrição G0/G1 tem natureza reversível da entrada e quiescência do ciclo celular. À medida que as células progredem no ciclo, perturbações podem ativar os pontos de verificação que prendem as células durante as transições de fase (os pontos de verificação são designados por raios amarelos)

Fonte: Adaptado Bower *et al.* (2017).

Uma vez que os cromossomos são duplicados corretamente, as células podem entrar no G2, outra fase de *Gap* para se preparar para a mitose (M). Assim, os pontos de verificação do ciclo celular garantem a progressão ordenada do ciclo celular e são críticos para manter a estabilidade genômica agindo como barreiras à carcinogênese, sendo frequentemente desregulados em tumores (BOWER *et al.*, 2017; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013; VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECO, 2016).

As vias de resposta a danos no DNA monitoram a integridade do complemento diplóide cromossômico. Duas proteínas-quinases do tipo fosfoinositídeo 3-quinase relacionadas, a ATM (ataxia telangiectasia mutada) e ATR (relacionadas à ATM e RAD3) quinases podem iniciar um ponto de verificação de danos ao DNA. A ATM quinase é ativada por quebras de DNA de fita dupla, enquanto o ATR responde ao dano no DNA de fita única. O ATM e o ATR fosforilam e ativam as quinases efetoras CHK2 e CHK1 (ponto de verificação quinase 2 e 1), respectivamente, que por sua vez fosforilam proteínas que impõem a parada do ciclo celular (DAVOLI; DE LANGE, 2011; MATSUOKA *et al.*, 2007; PETSALAKI; ZACHOS, 2020).

A via ATM/CHK2/p53 em G2 atrasa o início da mitose após o dano, sequestrando ciclina B1/CDK1 inativos no citoplasma, impedindo assim a entrada na mitose. A atenuação de qualquer ponto de verificação em G2 leva à instabilidade cromossômica (BOWER *et al.*, 2017).

Uma rede complexa de eventos de sinalização que interferem nas atividades das ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDKs) controlam a progressão do ciclo celular. As transições das fases são induzidas por níveis oscilantes de ciclinas-CDKs. Cada fase do ciclo celular é caracterizada pela formação de complexos específicos de heterodímeros ciclina/CDK (BOWER *et al.*, 2017; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013; RAVID *et al.*, 2002). A atividade quinase das CDKs é fortemente regulada pela (1) taxas de síntese e degradação das ciclinas (2) ligação a reguladores negativos (inibidores da CDK) e (3) eventos de fosforilação/desfosforilação do complexo cinase (Ciclina-CDK) (DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013; RAVID *et al.*, 2002).

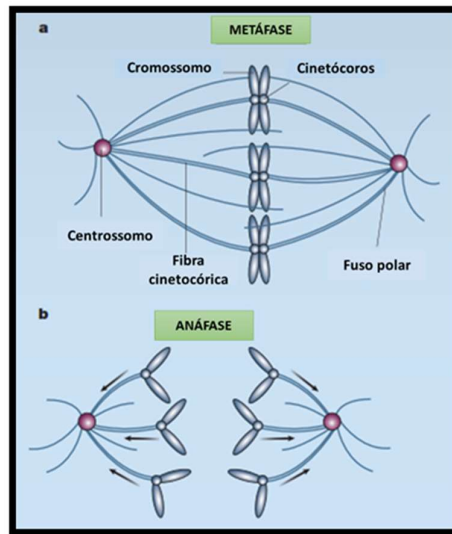
Uma etapa regulatória crítica na ativação de ciclina B-CDK1 é a quantidade de ciclina B disponível para formar um complexo com CDK1, essa ativação ocorre quando o nível de ciclina B atinge uma concentração limiar. Altos níveis de ciclina B são temporariamente restritos à fase G2 e início da mitose. A transcrição da ciclina B começa na fase S e atinge o pico no final do G2. A degradação da ciclina B é regulada na anáfase pelo Complexo Promotor de Anáfase/Ciclossomo (APC/C) e sua poli-ubiquitinação começa na metáfase, quando o SAC é silenciado (LINDQVIST; RODRÍGUEZ-BRAVO; MEDEMA, 2009).

Antes de iniciar a mitose, na fase S, a célula duplica seus cromossomos, produzindo pares de 'cromátides irmãs' e duplica seu centrôssomo (o centro organizador de microtúbulos), que se separa no início da mitose (HEALD, 2004; HOLLAND; CLEVELAND, 2009).

Na fase de prometáfase da mitose, os cromossomos ficam conectadas ao fuso, de modo que um membro de cada par é anexado a um feixe de microtúbulos que emanam de um polo e o outro ao oposto, formando um fuso bilateralmente simétrico. Os cinetócoros são as plataformas de ligação de microtúbulos nos cromossomos. Um “cabo de guerra” ocorre, impulsionado pela adição ou perda de tubulina (isto é, polimerização ou despolimerização de microtúbulos) nos cinetócoros. Isso resulta no alinhamento dos cromossomos durante metáfase da mitose. Finalmente, a anáfase começa quando proteínas de coesão que mantinham as cromátides unidas são degradadas e elas “decolam” em direção aos pólos opostos do eixo. Erros nesse processo levam ao registro

incorreto de cromossomos e à produção de células filhas aneuplóides (Figura 6) (HEALD, 2004; HOLLAND; CLEVELAND, 2009).

Figura 6: Estruturas envolvidas na segregação cromossômica.



Legenda: a. Na metáfase, os cromossomos já estão ligados por meio de seus cinetóforos aos feixes de filamentos de microtúbulos, no centro do fuso mitótico. b. Na anáfase, os cromossomos se separam ao longo das fibras cinetocóricas, à medida que os microtúbulos são despolimerizados.

Fonte: Adaptado Heald (2004).

A sinalização prejudicada ou hiperativada do SAC geralmente leva à formação de fusos multipolares e/ou à divisão desigual de cromátídeos irmãs em células filhas, (BOWER *et al.*, 2017; SINHA; DUIJF; KHANNA, 2019). Além das proteínas de *checkpoint* ligadas diretamente ao SAC (como MAD1, MAD2, BUB3, BUBR1 e CDC20) à medida em que as fases da mitose ocorrem, uma rede complexa e integrada de outras proteínas atuam com funções distintas e cruciais para o sucesso da divisão celular (CARMENA *et al.*, 2012).

Aurora A (AURKA) e PLK1, são exemplos de cinases centrossomais envolvidas na maturação dos centrosomos e na montagem do fuso. Outra proteína de ligação aos microtúbulos, a TPX2, também importante na maturação dos centrosomos, interage e ativa a AURKA. Essas três proteínas são necessárias para a coesão do centríolo e a bipolaridade do fuso; evitando conexões incorretas de microtúbulos-cinetócoros. Aurora B (AURKB) está localizada nos centrômeros na prometáfase e metáfase, já na anáfase

localiza-se no fuso mitótico, atua no alinhamento e condensação dos cromossomos, e desempenha um papel chave na citocinese (DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013; HOLLAND; CLEVELAND, 2009; LUCA; LAVIA; GUARGUAGLINI, 2006).

Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem estudado uma série de genes relacionados ao ciclo celular em diferentes metodologias, como FISH, qPCR e imunohistoquímica, de modo que reunimos uma gama de correlações importantes entre variáveis críticas na patogênese da SMD e a disfunção de genes de controle mitótico. A partir desses dados, demonstramos que a expressão desregulada desses genes, seja a nível gênico ou protéico, está relacionada a características importantes da doença, com destaque para a instabilidade cromossômica e alterações na linhagem megacariocítica (BORGES *et al.*, 2018; GENGA *et al.*, 2015; HEREDIA *et al.*, 2014).

Defeitos em todos esses pontos de verificação tem um papel integral no início do tumor e/ou progressão e afetam a sensibilidade dos tumores a drogas, associando instabilidade genética com resistência à morte celular apoptótica. Nos últimos anos, muitos autores chegaram à conclusão de que o câncer pode ser considerado uma doença do ciclo celular (BOWER *et al.*, 2017; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013; VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECO, 2016). Dessa forma, as informações sobre os pontos de controle e sua desregulação no câncer, juntamente com o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas podem oferecer novas oportunidades para o tratamento do câncer (VISCONTI; DELLA MONICA; GRIECO, 2016).

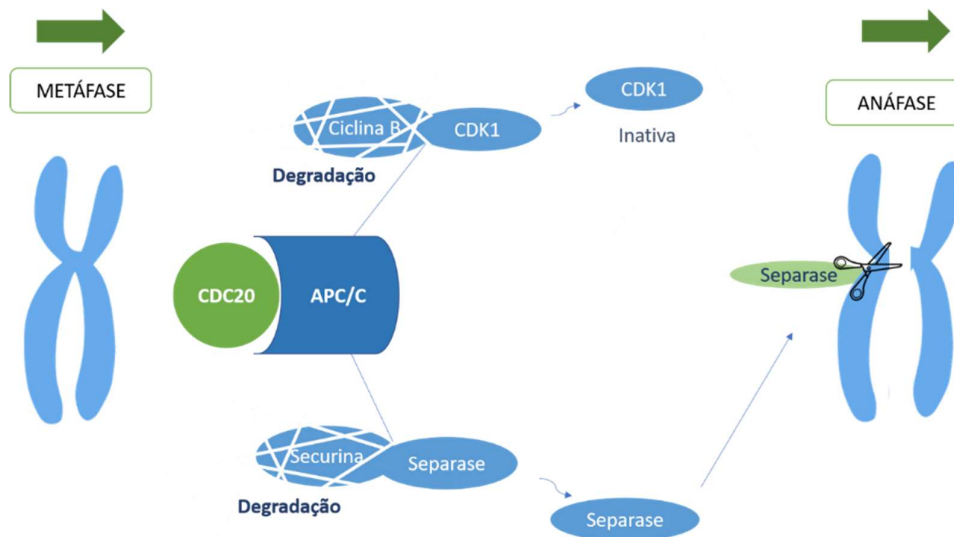
1.3 Gene *CDC20* (proteína do ciclo de divisão celular 20)

As fases do ciclo celular nas células eucarióticas têm uma duração de tempo precisa que varia consideravelmente de acordo com o tipo de célula. Por exemplo, em uma célula humana altamente proliferativa com um tempo total de duplicação de 24 horas, a fase G1 pode durar em torno de 11 horas, fase S em 8 horas, G2 em 4 horas e mitose em 1 hora. (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019).

Um dos reguladores mais importantes da divisão celular é o complexo CDK1-Ciclina B1, também conhecido como fator de promoção mitótica (FPM), que controla a progressão da fase G2 para a fase M e a própria mitose. CDK1 é um regulador crucial da transição mitótica e sua ativação leva à entrada na mitose. A atividade do FPM deve ser mantida da prófase à metáfase e subsequentemente desativada quando as células entram na anáfase (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019; TERHUNE *et al.*, 2020).

A inativação do FPM é obtida pela destruição da ciclina B1 imposta por um complexo E3 ubiquitina-proteína ligase, conhecido como complexo promotor de anáfase ou ciclossomo (APC/C) e sua subunidade alvo, a proteína do ciclo de divisão celular 20 (CDC20), que orchestra o início da anáfase e a saída da mitose por meio da degradação tempo-dependente da securina e ciclina B1 (Figura 7), regulando a duração exata do tempo da mitose (CHI *et al.*, 2019; GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019; LOK *et al.*, 2020; TERHUNE *et al.*, 2020).

Figura 7: CDC20 e seu papel no avanço da fase de metáfase para anáfase.



Legenda: O Complexo APC/C-CDC20 se torna ativo e, por sua vez, degrada a Securina e Ciclina B1. A separase, protease que quebra as coesinas que mantêm as cromátides irmãs unidas, é inibida por pelo menos dois mecanismos. O primeiro mecanismo envolve a ligação da securina, enquanto o segundo envolve a ligação da ciclina B associada à CDK1. A ligação da CDK1-ciclina B inibe a atividade da separase e da CDK1. A degradação da securina libera separase. Ao mesmo tempo, a degradação da ciclina B inativa CDK1, promovendo assim a saída da mitose.

APC/C = Complexo promotor de anáfase ou ciclossomo. CDK1 = Quinase dependente de ciclina 1.

Fonte: Adaptado de Ghelli L.D.R.; Martinelli G.; Simonetti G (2019); Holland et al., (2009)

O APC/C possui um núcleo catalítico responsável pela atividade da APC/C E3 ubiquitina ligase, que permite catalisar a geração de cadeias de poliubiquitina sobre seus substratos, desencadeando sua degradação pelo proteassoma 26S. A ligação da ubiquitina é um processo de várias etapas que envolve uma enzima ativadora da ubiquitina (E1), uma enzima conjugadora da ubiquitina (E2) e uma ubiquitina ligase (E3). Existem duas

enzimas E1 no genoma humano, aproximadamente 40 enzimas E2 e mais de 500 ligases E3 (SCHROCK *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015).

Assim, a ubiquitinação de substratos pela APC/C requer a formação de um complexo APC/C-ativador-substrato. O APC/C é controlado por dois ativadores principais, CDC20 e CDH1 (homólogo 1 do CDC20, também conhecido como proteína relacionada ao Fizzy 1, FZR1), cada um direcionado ao APC/C para substratos específicos em momentos precisos durante o ciclo celular. A ligação de CDC20 ou CDH1 ao APC/C induz uma mudança conformacional para os formatos ativos, APC/C^{CDC20} e APC/C^{CDH1}, respectivamente. Os domínios WD40 do CDC20 e CDH1 localizados em seus domínios C-terminais fornecem uma plataforma para recrutar substratos ao APC/C. (RICHESON *et al.*, 2020; SCHROCK *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015).

O APC/C^{CDC20} está presente no início da mitose até o início da anáfase, tendo como função a transição Metáfase/Anáfase. No início da mitose, o CDC20 se torna ativo e se associa à APC/C fosforilada, levando à degradação de substratos da prometáfase, como ciclina A e Nek2. A APC/C^{CDH1} está presente no início da anáfase até G1 e promove saída mitótica eficiente e manutenção do estado G1 (RICHESON *et al.*, 2020; SCHROCK *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015).

O APC/C^{CDC20} fica inativo durante a maior parte do ciclo celular devido a competição com CDH1. Os níveis de CDC20 são baixos e a APC/C necessita de fosforilação suficiente para a formação do complexo de APC/C^{CDC20} ativado, permitindo que CDH1 a supere na ligação à APC/C. O CDH1 é considerado um supressor de tumor, enquanto o CDC20 exibe uma função oncogênica (SCHROCK *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015).

Durante o início da mitose, o complexo APC/C^{CDC20} é inibido pelo *checkpoint* de montagem do fuso (SAC), que detecta cinetócoros desanexados ou incorretamente conectados. Isso garante que a ativação do APC/C^{CDC20} e, portanto, a saída mitótica, ocorram somente após todos os cromossomos terem atingido a fixação adequada do eixo bipolar (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019; LOK *et al.*, 2020; SCHROCK *et al.*, 2020).

Uma vez que o SAC está ativo, este induz a geração do complexo de *checkpoint* mitótico (MCC), gerando um sinal difusível capaz de inibir a degradação da Ciclina B. O MCC é composto por MAD1, MAD2, BUBR1(MAD3), BUB3 e CDC20. Assim, o complexo MCC-APC/C inibido contém duas moléculas de CDC20, que podem ser chamados de CDC20-A (o coativador ligado ao APC/C) e CDC20-M (ligado ao MCC).

Essa inibição APC/C pelo MCC ocorre para garantir tempo suficiente para a fixação adequada dos cromossomos antes do início da anáfase (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019; LOK *et al.*, 2020; RICHESON *et al.*, 2020; SANTIBÁÑEZ-ANDRADE *et al.*, 2019; SCHROCK *et al.*, 2020).

O MCC fosforila o CDC20-A inibindo-o, vários contatos com o CDC20-A são realizados para bloquear sua atividade, incluindo a ligação de sequências de caixa D em BubR1 ao receptor de caixa D do CDC20. Além disso, a caixa KEN e os domínios ABBA no BubR1 interagem com outros sítios no CDC20 para inibir eficientemente CDC20-A. A formação do MCC é dinâmica e é regulada por uma rede de proteínas cinases e fosfatases, incluindo a cinase MPS1, que por sua vez, é recrutado pela Aurora B (CARMENA *et al.*, 2012; RICHESON *et al.*, 2020; SCHROCK *et al.*, 2020).

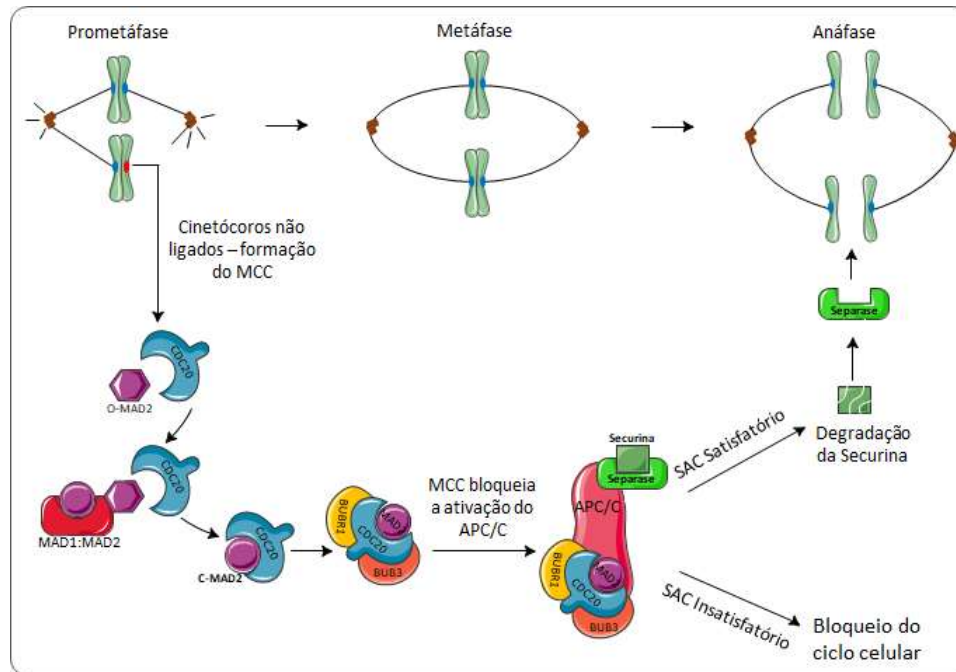
A ativação do SAC é iniciada pelo complexo MAD1–MAD2 nos cinetócoros, que servem como sinalizadores para converter outros MAD2 citosólicos de uma conformação aberta (O-MAD2) para uma conformação fechada (C-MAD2). Após essa remodelação estrutural, o domínio C-terminal do MAD2 é exposto para permitir que ele interaja com o CDC20. Assim que há a ligação C-MAD2 ao CDC20, o MCC é então montado. Quando os cinetóforos estiverem conectados corretamente, o SAC é chamado “satisfatório” e novos C-MAD2 não serão mais gerados. Os C-MAD2 existentes serão convertidos em O-MAD2 e o MCC é desmontado e liberado por um processo que envolve o p31^{cometa} e o TRIP13. Por fim, há a dissociação do MCC pelo complexo APC/C^{CDC20}, que requer a ubiquitinação do CDC20-M (Figura 8) (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019; LOK *et al.*, 2020; RICHESON *et al.*, 2020; SCHROCK *et al.*, 2020).

A partir disso, há a rápida desfosforilação do CDC20-A pela proteína fosfatase 2 (PP2A), o complexo APC/C^{CDC20} se torna ativo e, por sua vez, poliubiquitina proteínas estruturais e reguladoras necessárias para a saída da mitose, incluindo Securina e Ciclina B1. A degradação da securina libera separase, uma protease que quebra as moléculas de coesina nos cinetóforos das cromátides-irmãs. Como consequência disso, há a separação física das cromátides e elas, assim, segregam em direções opostas no final da anáfase (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019; SCHROCK *et al.*, 2020; TERHUNE *et al.*, 2020).

Além do complexo MAD1-MAD2, outros dois mecanismos de inibição APC/C^{CDC20} são descritos para permitir a transição G2/M. O primeiro mecanismo é via de inibição por Emi1. Embora pensado principalmente como um regulador de APC/C^{CDH1} na transição G1/S, Emi1 também é um potente inibidor de APC/C^{CDC20} e pode contribuir

para a regulação de APC/C durante a transição G2/M e mitose inicial. De fato, embora a maioria do Emi1 seja degradada no G2 para permitir a progressão mitótica, o pool restante é importante para a montagem do fuso mitótico (SCHROCK *et al.*, 2020).

Figura 8: Controle da divisão celular pelas proteínas do SAC



Legenda: A ativação do SAC é iniciada pelo complexo MAD1-MAD2 nos cinetócoros, que servem como sinalizadores para converter outros MAD2 citosólicos de uma conformação aberta (O-MAD2) para uma conformação fechada (C-MAD2). Após essa remodelação estrutural, o domínio C-terminal do MAD2 é exposto para permitir que ele interaja com o CDC20. Assim que há a ligação C-MAD2 ao CDC20, o MCC é então montado. Quando os cinetóforos estiverem conectados corretamente, o SAC é chamado “satisfatório”.

Fonte: Adaptado de Lara-Gonzalez; Westhorpe; Taylor (2012)

O segundo método de regulação do APC/C^{CDC20} é realizado por meio da fosforilação do CDC20, reduzindo sua afinidade de ligação ao APC/C. O CDK1 é capaz de fosforilar o CDC20, o que reduz sua afinidade pelo APC/C e permite o acúmulo de ciclina B, permitindo a transição G2/M. Da mesma forma, BUB1 e PLK1 fosforilam e inibem APC/C independentemente do MCC. Na mitose, o CDC20 deve ser então desfosforilado para se ativar, o qual é mediado pela fosfatase PP2A, um supressor de tumor conhecido. Essa fosfatase é essencial para a ativação do APC/C^{CDC20}. Com a depleção de PP2A em células funcionais, houve uma redução em sua capacidade de sair

da mitose. Essa disfunção resultou da incapacidade do CDC20 de associar e ativar o APC/C. Assim, a regulação adequada do CDC20 contribui para a manutenção mitótica e a estabilidade do genoma (SCHROCK *et al.*, 2020).

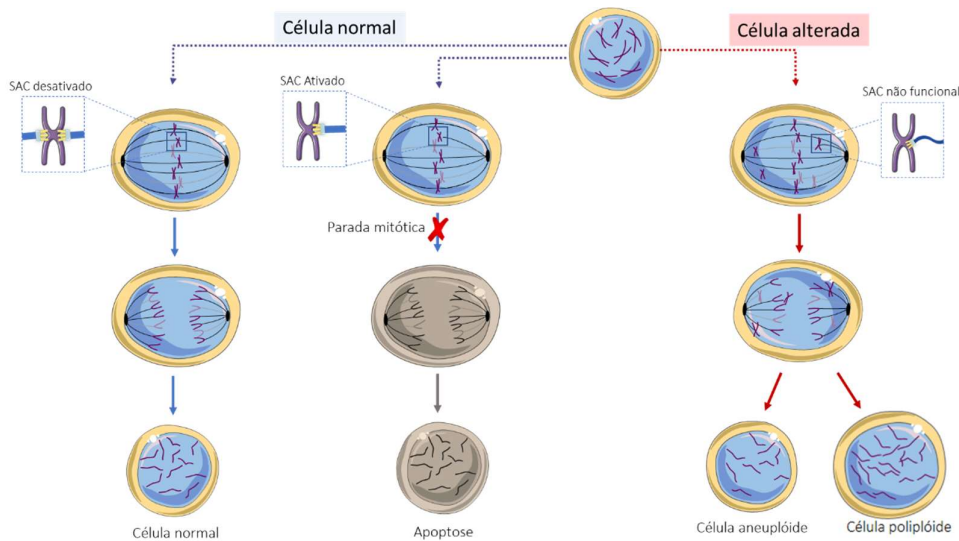
Vários estudos investigaram os mecanismos subjacentes ao atraso mitótico e as consequências biológicas da chamada "mitose prolongada". Diferentes tipos de estímulos, como ativação de oncogene, danos ao DNA ou erros de registro cromossômico, induzem mitose prolongada. Dado que a mitose é fisiologicamente restrita para um período de tempo preciso, a mitose prolongada (1,5 a 2,5h ou mais) pode levar a consequências catastróficas, como aneuploidia e transformação maligna (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019).

Células “presas” em uma mitose “prolongada” apresentam possíveis destinos característicos: (1) completa divisão celular mesmo na presença de parada mitótica, devido a anáfase e citocinese prematura frequentemente acompanhada de segregação errada dos cromossomos, levando à aneuploidia; (2) morte celular na mitose (danos graves no DNA ou mitose prolongada podem induzir apoptose direta); (3) um fenômeno conhecido como “adaptação do ponto de verificação” ou *Mitotic Slippage* no qual há um desvio mitótico em que as células contornam a mitose e retornam à interfase sem divisão celular (como células tetraplóides). Essas células podem parar na intérfase e, eventualmente, entrar na quiescência celular ou morrer após esse desvio mitótico (Figura 9) (GHELLI ; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019).

Os danos no DNA induzem apoptose ou senescência como resposta celular ao potencial oncogênico de alterações genéticas. Após a identificação de danos os pontos de verificação de G2 e mitose são acionados, o que subsequentemente resulta na chamada catástrofe mitótica (ou morte mitótica) (SANZ-GÓMEZ *et al.*, 2020).

O *Mitotic slippage* (MS) é uma estratégia única de defesa da célula neoplásica contra as consequências aos danos do DNA que ocorrem durante a mitose e está associada à instabilidade genética. O aumento de CDC20 conduz a um ciclo mitótico desregulado, em parte por oprimir a capacidade inibitória do SAC; uma vez que o SAC é capaz de bloquear a função de CDC20 enquanto ligado ao APC (este pode sequestrar apenas duas moléculas de CDC20 simultaneamente). A superacumulação de CDC20 pode forçar a ativação do APC apesar de um SAC ativo e conduzir a célula a um ciclo mitótico desregulado (referido como MS) resultando em proliferação desregulada (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019; VANGENDEREN; HARKNESS; ARNASON, 2020).

Figura 9: Destinos diversos das células diante de distúrbio mitóticos.



Legenda: Células “presas” em uma mitose “prolongada” apresentam possíveis destinos característicos: (1) completa divisão celular mesmo na presença de parada mitótica, devido a anáfase e citocinese prematura frequentemente acompanhada de segregação errada dos cromossomos, levando à aneuploidia; (2) morte celular na mitose (danos graves no DNA ou mitose prolongada podem induzir apoptose direta); (3) um fenômeno conhecido como “adaptação do ponto de verificação” ou “derrapagem mitótica” no qual há um desvio mitótico em que as células contornam a mitose e retornam à interfase sem divisão celular (como células tetraplóides).

Fonte: Adaptado de Ghelli L.D.R.; Martinelli G.; Simonetti G (2019).

Um dos mecanismos subjacentes à derrapagem mitótica é uma degradação gradual da ciclina B1 durante a parada mitótica. Para apoiar isso, as células sem atividade de APC/C^{CDC20} são incapazes de sofrer o MS. A redução de MAD2 nos cinetóforos durante a parada mitótica inicia um enfraquecimento gradual do SAC, permitindo que o APC/C^{CDC20} degrade a ciclina B1 de maneira dependente do proteassoma para promover o MS. Além disso, durante a parada mitótica tardia, o nível de MAD2 é reduzido em cinetóforos não acoplados e há um escape da inibição mediada por SAC, como consequência disso pode ocorrer a fuga da morte celular, ou seja, o *Mitotic slippage* (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019; LOK *et al.*, 2020).

O mau funcionamento do APC/C^{CDC20} geralmente resulta em instabilidade cromossômica que pode predispor as células normais a se tornarem malignas. Dessa forma, a superexpressão de *CDC20* tem sido associada a uma infinidade de tipos diferentes de câncer, como próstata, gástrico, cólon, glioblastoma, ovário, colo de útero e

endometrial, bexiga, mama, linfomas difusos de células B, fígado e pulmão. O aumento da expressão de *CDC20* permite que uma célula desvie do SAC e saia da mitose prematuramente, levando à instabilidade genômica. Essa hiperexpressão geralmente resulta em um prognóstico ruim para os pacientes devido aos efeitos do *CDC20* em uma variedade de processos celulares (CHI *et al.*, 2019; SCHROCK *et al.*, 2020).

Uma melhor compreensão desse processo e de seus agentes moleculares ajudaria a definir biomarcadores que podem distinguir entre pacientes que provavelmente se beneficiarão de um regime terapêutico incluindo inibidores mitóticos e aqueles que podem não se beneficiar devido essa estratégia (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019).

Notavelmente, o *CDC20* parece desempenhar um papel importante em uma série de vias celulares a partir de sua hiperexpressão em células-tronco cancerígenas. O aumento da expressão de *CDC20* parece estar correlacionada com a ativação da via WNT/ β -catenina, que está fortemente associada à progressão do câncer (LI, J *et al.*, 2020; SCHROCK *et al.*, 2020). Pela via canônica, após a ativação do WNT, a β -catenina é estabilizada e translocada para o núcleo. O *CDC20* induz a degradação do Axin1, um regulador chave da β -catenina, por meio de sua atividade proteassomal. Isso fornece uma relação direta para o *CDC20*, contribuindo para a regulação positiva da β -catenina e levando à progressão do câncer (SCHROCK *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019).

Outro mecanismo pelo qual as células-tronco cancerígenas podem ser mantidas pelo APC/ C^{CDC20} é realizado a partir da via de sinalização SOX2. SOX2 é um fator de transcrição associado à pluripotência. O SOX2 controla uma série de características das células cancerígenas, como proliferação, migração, invasão, iniciação de tumores, formação de células-tronco cancerígenas, bem como resistência à apoptose e à terapia (NOVAK *et al.*, 2019; SCHROCK *et al.*, 2020). Foi demonstrado que o APC/C forma um complexo com SOX2 nuclear e mantém sua estabilidade, contribuindo para a capacidade das células neoplásicas de se auto-renovarem. Ainda não está claro como essa estabilidade é alcançada, no entanto, especula-se que é possível que o APC/ C^{CDC20} induza modificações pós-traducionais no SOX2, proporcionando sua estabilização (SCHROCK *et al.*, 2020).

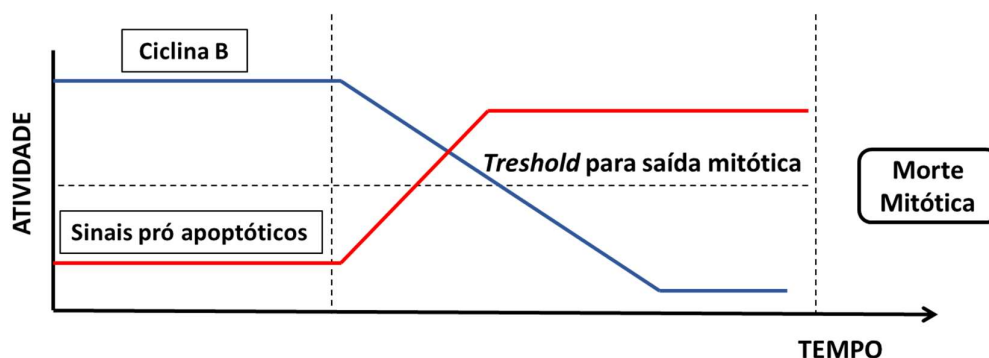
As células iniciadoras de tumor podem ser mantidas pelo *CDC20* por meio da degradação de p21, que desempenha um papel central na supressão dessas células. O p21 funciona como um inibidor da CDK e, portanto, desempenha um papel importante no controle do ciclo celular (SCHROCK *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019). O *CDC20*

também desempenha um papel na regulação do SMAR1, um supressor de tumor que funciona para regular o genoma, o ciclo celular e apoptose. O SMAR1 funciona ativando o p53 para interromper as células na transição G1 e G2/M. Pesquisas adicionais, usando linhagens celulares de câncer de mama, ovário, melanoma, colo uterino e cólon, elucidaram que o CDC20 regula a degradação do SMAR1 por meio da ubiquitinação (SCHROCK *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019).

A morte mitótica é um mecanismo onco-supressor que tem como alvo células com mitose defeituosa, a fim de preservar a integridade genética e vários agentes moleculares estão envolvidos em sua regulação. A regulamentação oportuna e equilibrada da maquinaria do ciclo celular e dos sinais apoptóticos durante a parada mitótica determina o *Mitotic slippage* versus o destino de morte celular. A regulação intrínseca mediada por APC/C^{CDC20} de várias proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas desempenham um papel crucial no ajuste fino da resposta celular e sugerem que a combinação de drogas direcionadas a proteínas anti-apoptóticas e anti-mitóticos pode fornecer efeitos sinérgicos (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019).

Vários estudos demonstraram que a falha no tratamento usando agentes inibidores de microtúbulos, como taxanos e alcalóides é devido ao *Mitotic slippage* nas células cancerígenas. Do ponto de vista mecanicista, a rápida degradação da ciclina B1 e a lenta indução de sinais pró-apoptóticos durante a parada mitótica podem levar a esse fenômeno. A hiperexpressão da proteína anti-apoptótica BCL2 pode impedir a morte de células mitoticamente presas por tempo suficiente para que os níveis de ciclina B1 caiam abaixo de um limiar para derrapagem mitótica. Por outro lado, a rápida indução de sinais pró-apoptóticos na presença de ciclina B1 ativa geralmente leva à morte celular (Figura 10) (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019).

Figura 10: Representação gráfica do momento da redução do nível de ciclina B1 e o aumento de sinais pró-apoptóticos na corrida pela morte celular mitótica.



Legenda: A rápida degradação da ciclina B1 e a lenta indução de sinais pró-apoptóticos durante a parada mitótica podem levar ao deslizamento mitótico. Evidências sugerem que a superexpressão da proteína anti-apoptótica BCL2 pode impedir a morte de células mitoticamente presas por tempo suficiente para que os níveis de ciclina B1 caiam abaixo de um limiar para derrapagem mitótica. Por outro lado, a rápida indução de sinais pró-apoptóticos na presença de ciclina B1 ativa geralmente leva à morte celular.

Fonte: Adaptado de Ghelli L.D.R.; Martinelli G.; Simonetti G (2019).

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que o CDC20 parece ter desempenhado um papel tanto na regulação positiva como negativa da apoptose. O APC/C^{Cdc20} age na destruição tanto do BIM, um membro da família pró-apoptótico BH3-apenas, quanto o MCL-1, com atividade antiapoptótica. Foi demonstrado que BIM se liga especificamente ao domínio WD-40 de CDC20, permitindo a polubiquitinação de BIM e levando à sua subsequente degradação e promovendo resistência à indução de apoptose por agentes anti-mitóticos. A rápida indução de sinais pró-apoptóticos também ocorre na presença do complexo Ciclina-CDK1 ativo que induz apoptose durante a mitose prolongada, a família pró-apoptótico BH3-apenas, BIM, sofre fosforilação dependente de CDK1 em células de leucemia após tratamento com os agentes alvo do microtúbulo. Essa fosforilação do BIM nas mitocôndrias se correlaciona com a parada mitótica e precede a morte celular. A degradação da ciclina B1 pelo APC/C^{Cdc20} por sua vez compromete a capacidade desse complexo de promover apoptose (como a perda de fosforilação de BCL-xL ou BIM), gerando células poliplóides viáveis por meio de derrapagem mitótica (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019; SCHROCK *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015).

Como a morte provocada por agentes antimitóticos é modulada pela capacidade das células de induzir apoptose e pela duração da parada, essas observações sugeriram que o APC/C desempenha um papel central na resposta celular aos antimitóticos, coordenando ambas as vias de determinação do destino da célula (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019; SCHROCK *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015)

O papel do CDC20 na regulação da apoptose tem implicações claras para a resposta terapêutica e seria importante entender melhor se as diferenças específicas de células ou tecidos podem influenciar sua capacidade de coordenar os mecanismos que regulam o *Mitotic slippage* e a sobrevivência celular. Além da regulação pró-apoptótica e anti-apoptótica, a indução de apoptose em células mitoticamente presas tem sido associada ao acúmulo de danos no DNA durante a mitose prolongada. Assim, a parada mitótica é um estímulo intrínseco que leva à ativação da resposta a danos no DNA (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019; SCHROCK *et al.*, 2020).

O bloqueio da progressão mitótica é uma abordagem eficaz para induzir a morte mitótica das células cancerígenas. A inibição de várias etapas durante a mitose, como controle mitótico, polimerização de microtúbulos, segregação cromossômica, citocinese e saída da mitose, tem sido considerada para o desenvolvimento de drogas anti-mitóticas. Assim, uma melhor compreensão desse processo e de seus agentes moleculares ajudaria a definir biomarcadores que podem distinguir entre pacientes que provavelmente se beneficiarão de um regime terapêutico incluindo inibidores mitóticos e aqueles que podem não se beneficiar devido o *Mitotic slippage*, abrindo para estes uma avenida de potenciais alvos terapêuticos a serem testados (CHI *et al.*, 2019; GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019).

A perda de TP53 e a rápida degradação da ciclina B1 parecem promover o *Mitotic slippage* durante a parada mitótica. Nesse contexto, a hiperexpressão de moléculas-chave da APC/C, como CDC20, podem atrapalhar o equilíbrio entre o *MS* e morte mitótica em favor da sobrevivência celular (GHELLI; MARTINELLI & SIMONETTI, 2019). Assim, a inibição do APC/C^{CDC20} é uma terapia de câncer atraente devido ao papel essencial que o APC/C desempenha na regulação do ciclo celular e suas contribuições para outras vias de promoção do câncer (SCHROCK *et al.*, 2020).

O CDC20 é o principal objetivo clínico da APC/C, pois é o coativador essencial para a saída da mitose. Modelos murinos e experimentos pré-clínicos ressaltam que a inibição de CDC20 é uma terapia eficaz para o câncer, o desenvolvimento de um medicamento solúvel para estudos *in vivo* que também exhibe especificidade de tumor permanece um desafio (SCHROCK *et al.*, 2020).

1.4 Gene *CEP55* (proteína centrossomal 55)

O processo do ciclo celular controla a organização central da vida. Nos seres humanos, as etapas do ciclo celular são reguladas por um conjunto de proteínas, funcionando em cascata, reguladoras de pontos de verificação do fuso ou como elementos-chave de regulação de um centro de organização de microtúbulos. O fuso mitótico é a estrutura que garante a segregação cromossômica correta na divisão celular (KALIMUTHO *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2013; LUCA; LAVIA; GUARGUAGLINI, 2006).

Em células de mamíferos, os microtúbulos que compõem o fuso são principalmente organizados a partir de uma organela especializada, o centrossomo. As

proteínas centrossômicas são reconhecidas como cruciais na regulação do fuso mitótico, na organização dos microtúbulos e, portanto, são essenciais para a progressão do ciclo celular (KALIMUTHO *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2013; LUCA; LAVIA; GUARGUAGLINI, 2006).

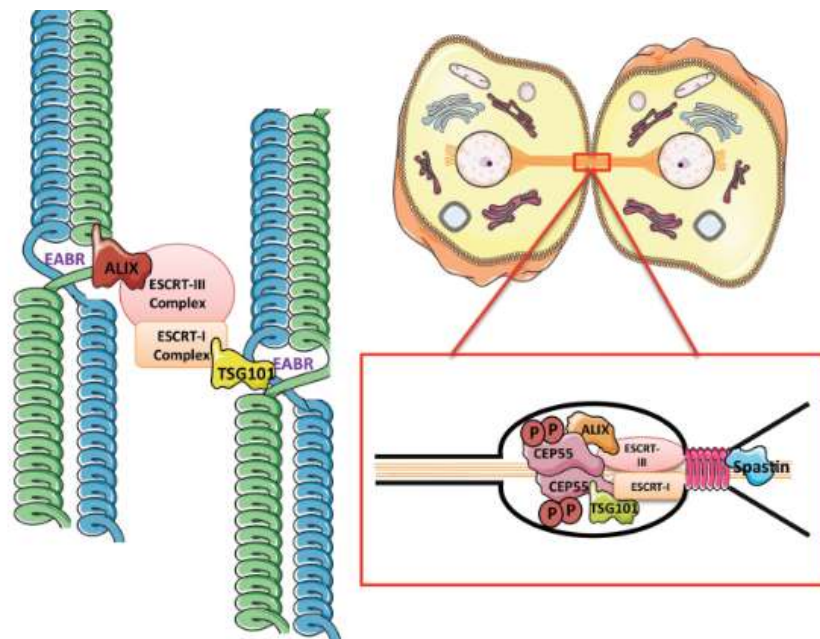
A proteína centrossômica de 55 kDa (CEP55), também conhecida como C10orf3 e FLJ10540, é um membro essencial das proteínas da família CEP que se localiza diferencialmente no centrossomo nas células interfásicas, no fuso central durante a anáfase e no corpo médio durante a saída mitótica e citocinese. Essa proteína desempenha uma função vital para conclusão da abscisão celular e o recrutamento sequencial de proteínas para o corpo médio ocorre de maneira dependente da CEP55 (CHANG *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016; KALIMUTHO *et al.*, 2018; LI, M *et al.*, 2018).

O centrossomo é composto por dois centríolos cercados por uma nuvem de material denso em elétrons conhecido como matriz pericentriolar (HOLLAND; CLEVELAND, 2009). A CEP55 se localiza não apenas na matriz pericentriolar, mas também está associado ao centríolo-mãe, permanece no centrossomo durante todo o ciclo celular e é recrutado para o fuso mitótico durante a mitose (JEFFERY *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2013).

A CEP55 foi descrita inicialmente por abranger 464 aminoácidos e apresentar uma estrutura homodimérica, codificada por um gene localizado no cromossomo 10q23.33 (CHANG *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2013). Assim como muitas outras proteínas centrossômicas, CEP55 é uma proteína altamente espiralada e possui uma região articulável que foi denominada de EABR (região de ligação ESCRT e ALIX) e é fundamental para o seu papel na citocinese (JEFFERY *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2013; LI, M. *et al.*, 2018).

As proteínas ESCRT (complexo de classificação endossômica requerido para o transporte), TSG101 (gene de susceptibilidade a tumores 101) e ALIX (proteína X que interage com ALG2- gene-2 ligado à apoptose) são recrutadas de maneira sequencial e dependente de CEP55. Embora existam múltiplos complexos ESCRT (0, I, II e III), o ESCRT-III é o mais crítico para a citocinese, formando estruturas filamentosas longas que criam o local da constrição e garante a abscisão celular (Figura 11) (JEFFERY *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2013; LI, M *et al.*, 2018).

Figura 11: Estrutura da CEP55 e sua ligação com o complexo de proteínas ESCRT, ALIX e TSG101.



Legenda: CEP55 é uma proteína altamente espiralada e possui uma região articulável que foi denominada de EABR (região de ligação ESCRT e ALIX). Cada homodímero se liga apenas uma molécula ALIX ou TSG101 por meio do seu domínio EABR. A proteína ALIX recruta diretamente o complexo ESCRT-III enquanto o TSG101 recruta ESCRT-III via ligação com ESCRT-I. O ESCRT-III então recruta a proteína Spastin que cliva todos os microtúbulos restantes que ligam às duas células filhas concluindo, assim, a citocinese.

Fonte: Adaptado Jeffrey et al., 2016.

Cada homodímero se liga apenas uma molécula ALIX ou TSG101 por intermédio do seu domínio EABR. A proteína ALIX recruta diretamente o complexo ESCRT-III enquanto o TSG101 recruta ESCRT-III via ligação com ESCRT-I. Esse recrutamento é CEP55 dependente e possibilita a formação de uma estrutura espiralada de 17nm que cria um sítio de constricção (Figura 15 - estrutura espiralada rosa à direita). A partir disso, ESCRT-III então recruta a proteína *Spastin* que cliva todos os microtúbulos restantes que ligam às duas células filhas concluindo, assim, a citocinese (JEFFERY *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2013).

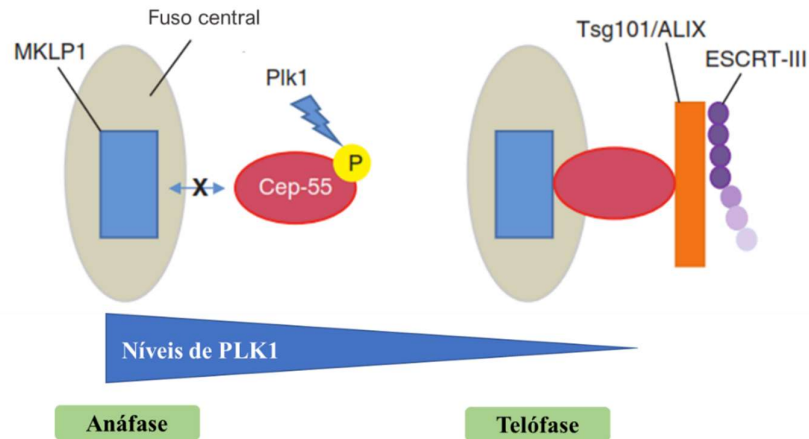
A localização da CEP55 no fuso central e no corpo médio é mediada por uma interação com o complexo do fuso central (composto por MKLP1 e MgcRacGAP) por contato direto com MKLP1 (IWAMORI *et al.*, 2010; JEFFERY *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2013)

O CEP55 tem como alvo várias outras proteínas estruturais e reguladoras necessárias para a conclusão da citocinese no corpo médio, incluindo Aurora B, MKLP2, PRC1, ECT2, Anilina e Sintaxina 2, demonstrando que o CEP55 é indispensável para a manutenção da estrutura do corpo médio. Também foi recentemente demonstrado que o gene *BRCA2* promove a capacidade do CEP55 para recrutar TSG101 e ALIX para o meio do corpo, independente de sua função no reparo do DNA, embora o envolvimento do *BRCA2* na citocinese permanece controversa, não sendo esta requerida para que a citocinese ocorra (JEFFERY *et al.*, 2016; PETSALAKI; ZACHOS, 2020).

Como cada homodímero de CEP55 liga apenas a uma cópia de ALIX ou TSG101, vários homodímeros de CEP55 são necessários para a abscisão. Células com deficiência em CEP55 apresentam citocinese defeituosa e como resultado uma proporção aumentada de células multinucleadas e/ou células paradas no estágio corpo médio. ALIX e TSG101 competem pela ligação à região EABR do CEP55, os quais se ligam ao EABR com afinidade e estequiometria semelhantes. O EABR é ligado pelos resíduos 781 a 869 do ALIX e 157 a 236 de TSG101, ambos contêm o domínio GPPX3Y, local onde ocorrerá essa ligação (IWAMORI *et al.*, 2010; JEFFERY *et al.*, 2016).

À medida que as células entram na mitose, a CEP55 é fosforilada nas serinas 425 e 428 por CDK1/ERK2. A proteína PLK1, por sua vez, promove sua fosforilação na serina 436, convertendo o CEP55 em uma conformação mais estável. A fosforilação do CEP55 pelo PLK1 regula negativamente o momento do recrutamento do CEP55 no meio do corpo, inibindo sua interação com o MKLP1. A CEP55 só pode ser direcionada para o meio do corpo quando a PLK1 estiver degradada, impedindo o recrutamento prematuro de CEP55 para o corpo médio. Assim, o CEP55 não é recrutado para o meio do corpo até a anáfase tardia, momento em que o PLK1 está sendo degradado devido à saída mitótica (Figura 12) (CHANG *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016).

Figura 12: PLK1 é um gatilho para o início da abscisão pelo controle temporal do recrutamento do ESCRT via CEP55.



Legenda: O recrutamento do CEP55 para o meio do corpo é um passo importante na abscisão. Durante a anáfase, o CEP55 é fosforilado por PLK1, o que impede a interação do CEP55 com o MKLP1 e, portanto, impede o acúmulo de CEP55 no meio do corpo. Durante a progressão em direção à saída mitótica, o PLK1 é degradado, levando à desfosforilação do CEP55, que então interage com o MKLP1 e se acumula no meio do corpo. Somente após a degradação do PLK1, o CEP55 se acumula no meio do corpo e, assim, promove os estágios finais da abscisão por recrutando Tsg101 e ALIX.

Fonte: Adaptado de Neto & Gould (2011).

Assim, a atividade da PLK1 é alta no início do ciclo celular, mas começa a declinar na anáfase. A degradação da PLK1 é um passo inicial crucial na citocinese, uma vez que ela controla a localização da CEP55, como mencionado. À medida que a atividade da PLK1 cai, a CEP55 se acumula na zona intermediária e começa a orquestrar a montagem do sulco de clivagem. A depleção do CEP55 resulta no acúmulo fracassado de fatores de abscisão de ação tardia no meio do corpo, incluindo proteínas do ESCRT, Aurora B e PLK1 (BHUTTA; MCINERNY; GOULD, 2014; CHEN; HEHNLY; DOXSEY, 2012; NETO; GOULD, 2011).

Além da PLK1, a AURKB cinase também coordenam eventos finais da separação celular. Assim como a PLK1, a Aurora B diminui durante a citocinese até permanecer no meio do corpo inativada. O papel dessa cinase na regulação da progressão da abscisão consiste no fato de que o ESCRT-III é um alvo direto dessa cinase. A inativação prematura da Aurora B promove a abscisão, uma observação que levou à sugestão de que

existe um ponto de verificação mediado pela Aurora B para regular a entrada na citocinese (BHUTTA; MCINERNY; GOULD, 2014; CHEN; HEHNLY; DOXSEY, 2012).

A inibição de PLK1 ou expressão de CEP55 mutada no local de fosforilação de PLK1 (S436A) resulta em localização prematura e níveis mais altos de CEP55 no meio do corpo. Esse recrutamento precoce afeta a estrutura do corpo médio e resulta em falha na citocinese, indicando que o recrutamento espaço-temporal do CEP55 é essencial para a integridade dessa estrutura e que a fosforilação no SER-436 é absolutamente necessária para a função da CEP55 e para o êxito da abscisão (BHUTTA; MCINERNY; GOULD, 2014; CHANG *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016; NETO; GOULD, 2011).

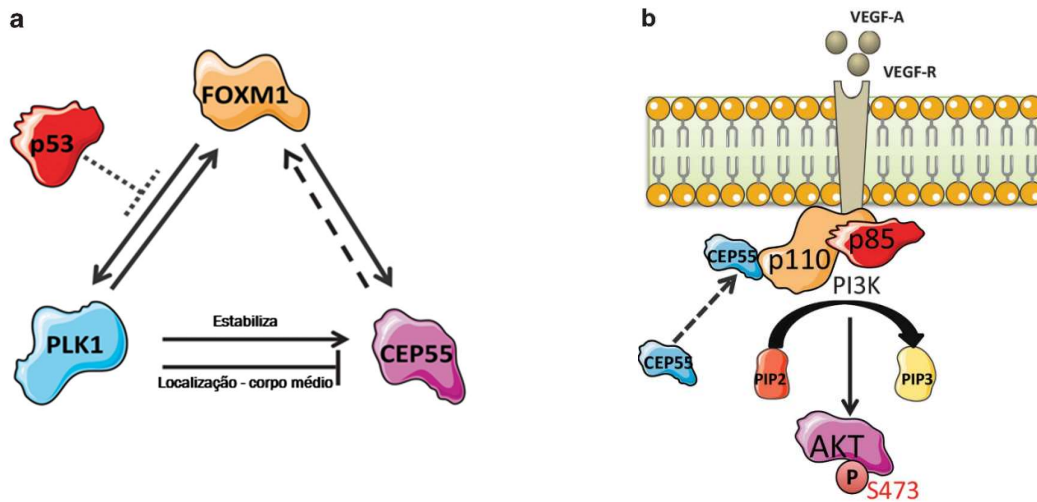
A regulação positiva de CEP55 e a inativação ou mutação de p53, um potente supressor de tumor, ocorrem em muitos cânceres humanos. A expressão de CEP55 é reprimida via p53 como resultado da regulação negativa dos níveis de proteína PLK1, p53 liga-se diretamente ao promotor PLK1 e inibe a transcrição de PLK1, que por sua vez compromete a estabilidade da proteína CEP55. A hiperexpressão de PLK1 e a eliminação da expressão de p53 aumentaram a estabilidade protéica pós-tradução do CEP55. Enquanto que, a utilização de um inibidor seletivo de PLK1, impediu o acúmulo de CEP55 nas células knockout para p53. Assim, o eixo p53-PLK1-CEP55 pode desempenhar um papel importante no surgimento do câncer, uma vez que, a hiperexpressão de CEP55 pode coincidir com uma alta incidência de mutações de p53 em cânceres humanos (CHANG *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016; SINHA *et al.*, 2019).

A p53 também regula negativamente vários fatores de transcrição, como c-Myc e FOXM1, bem como genes associados à progressão do ciclo celular, além da PLK1, Ciclina B1 e outros, por vários mecanismos. Portanto, a p53 pode também influenciar indiretamente a expressão do CEP55 por meio do controle dos níveis de FOXM1. Esse gene é superexpresso em muitos tumores humanos e é associado à instabilidade cromossômica (CHANG *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016).

Há evidências de que o p53 pode reprimir a transcrição e expressão da proteína FOXM1. O CEP55 é um alvo do FOXM1 que se liga diretamente ao seu promotor. Existe, assim, em um loop de feedback positivo com o FOXM1, pelo qual o CEP55 promove a expressão do FOXM1, o que resulta em aumento da transcrição do CEP55. Curiosamente, FOXM1, um substrato de PLK1, é ligado e fosforilado por PLK1 em G/M. O complexo PLK1-FOXM1 ativa subsequentemente a atividade transcricional da FOXM1, necessária para a expressão dos principais reguladores mitóticos, incluindo o próprio PLK1. Esse rede de regulação FOXM1-PLK1-CEP55 (Figura 13a) garante uma regulamentação

rígida das redes de transcrição essenciais para a progressão mitótica ordenada (CHANG *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016; SINHA; DUIJF; KHANNA, 2019).

Figura 13: Representação dos eixos de interação CEP55-FOXM1-PLK1 e CEP55-PI3K-AKT



Legenda: (a) CEP55-FOXM1-PLK1, o CEP55 pode promover a expressão do FOXM1, que resulta em aumento da transcrição do CEP55, enquanto PLK1 ativa a atividade transcripcional da FOXM1 que, por sua vez, é necessário para a ativação do próprio PLK1 e p53 funciona como regulador do eixo PLK1-FOXM1 e pode regular indiretamente a expressão do CEP55. A proteína PLK1 induz a estabilização e ativação da CEP55 e regula a localização da CEP55 no corpo médio, induzindo esse deslocamento apenas momentos antes da citocinese (b) o eixo CEP55-PI3K-AKT, a CEP55 se liga à proteína p110 e essa interação aumenta a estabilidade dessa subunidade resultando no aumento da ativação do AKT (a partir da conversão de PIP2 em PIP3), levando ao aumento da fosforilação da serina 473. A interação CEP55/PIK3CA é mediada pelo VEGF-A, que promove a localização do CEP55 na membrana plasmática, onde reside o complexo PI3K.

Fonte: Adaptado Jeffrey *et al.* (2016).

Uma das principais vias de sobrevivência celular é a via PI3K/AKT. PI3K fosforila 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP2), convertendo-o em fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), que leva a um aumento subsequente na ativação do AKT. O AKT tem diversos papéis na sobrevivência celular, ciclo celular, angiogênese, síntese de proteínas e metabolismo. Essa via é desregulada em vários cânceres principalmente por meio da mutação da PIK3CA (também conhecida como p110), a subunidade catalítica da PI3K. É relatado que o CEP55 se liga a proteína p110 e essa ligação aumenta a estabilidade dessa subunidade, resultando na hiperativação do AKT, conforme observado por um aumento na fosforilação da serina 473 (JEFFERY *et al.*, 2016; LI, M. *et al.*, 2018; SINHA *et al.*, 2019).

A interação CEP55/PIK3CA pode ser mediada pelo VEGF-A (Fator de crescimento endotelial vascular A), que promove a localização do CEP55 na membrana plasmática, onde reside o complexo PI3K (Figura 13b). A superexpressão do CEP55 leva à regulação positiva da via de sinalização PI3K/Akt, resultando em um ciclo celular desregulado por inibição de p21 (JEFFERY *et al.*, 2016; LI, Feng *et al.*, 2018; SINHA; DUIJF; KHANNA, 2019). Estudos com células *knockout* para CEP55 apresentam diminuição da viabilidade celular, a típica parada da mitose e entrada na morte celular programada, a partir da inativação da via de sinalização PI3K/AKT/p21 em linhagem celular de glioma U251 (LI, F. *et al.*, 2018).

Nos tecidos adultos, o CEP55 é mais altamente expresso nos testículos e nas linhagens celulares de câncer. Nas células germinativas (testículos e ovários), o CEP55 localiza-se em pontes intracelulares, compostas por componentes gerais de citocinese com fatores adicionais específicos de células germinativas, incluindo TEX14. O TEX14 é uma cinase inativa que atua como um inibidor endógeno do CEP55 por apresentar o domínio GPPX3Y que interage fortemente com o região de dobradiça do CEP55 bloqueando as interações do CEP55 com TSG101 e ALIX, resultando na formação de uma ponte intercelular estável a partir bloqueio da citocinese. A formação desses “canais” é uma característica da diferenciação de células germinativas, atuando para sincronizar as células através da transferência de organelas e moléculas. A importância dessas pontes é destacada pela ausência dessas pontes levando esterilidade masculina observada em camundongos *knockout* para o TEX14 (IWAMORI *et al.*, 2010; JEFFERY *et al.*, 2016; SINHA *et al.*, 2018).

Um mecanismo adicional pelo qual o TEX14 pode competir com mais eficiência pelo CEP55 é por meio de sua interação com o MKLP1. O TEX14 tem a capacidade de no início do processo de citocinese, ligar-se ao MKLP1 e "preencher" a ponte intercelular, levando também a inibição da citocinese (IWAMORI *et al.*, 2010).

Existe um consenso entre os estudos de que a deficiência de CEP55 leva a falha na citocinese e à formação de células multinucleadas (FABBRO *et al.*, 2005; IWAMORI *et al.*, 2010; JEFFERY *et al.*, 2016; KALIMUTHO *et al.*, 2018), ao mesmo tempo que alguns estudos relatam que a hiperexpressão do mesmo também pode levar ao mesmo destino (CHANG *et al.*, 2012; LI, M. *et al.*, 2018; QI; LIU; WANG, 2018; SINHA *et al.*, 2019). Adicionalmente, Kuma *et al.* (2013) afirma que a expressão desregulada de CEP55, sob baixos níveis ou hiperexpressão, causa aneuploidia e múltiplos polos de fuso.

Dessa forma, seja pelos mesmos mecanismos ou não, o desequilíbrio dessa proteína parece convergir para a falha na abscisão e o surgimento de células poliplóides.

Para exemplificar, o estudo de Fabbro *et al.* (2005) observou que a maioria das células com baixa expressão de CEP55 falhou em concluir a citocinese. Consistente com isso, essas células vivas permaneceram em uma posição pós-telófase, conectadas por uma ponte citoplasmática fina por um período prolongado de tempo, aumentando seu período mitótico em até 7 horas antes da regressão do sulco de clivagem, resultando em uma célula binucleada. Essas células binucleadas não tiveram dificuldade em entrar na próxima divisão celular, mas novamente não conseguiram se separar por um período prolongado, resultando em multinucleação. Essas observações indicam, claramente, que o CEP55 pode até não ser necessário para a progressão normal das fases da mitose, mas é essencial para a conclusão bem-sucedida da citocinese.

Na última década, vários estudos tem mostrado associações entre o CEP55 superexpresso e a proliferação, migração e invasão celular, portanto, um fator relacionado, também, ao mau prognóstico de diversos cânceres como de pulmão, fígado, mama, gástrico e oral, entre outros (CHANG *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016; KALIMUTHO *et al.*, 2018; LI, Feng *et al.*, 2019, 2018; LI, M. *et al.*, 2018; QI; LIU & WANG, 2018; SINHA *et al.*, 2018).

Em um estudo robusto com modelos murinos, Sinha *et al.* (2019) teve como objetivo identificar se a hiperexpressão do CEP55 causaria tumorigênese espontânea *in vivo*. Assim, foi demonstrado achados cruciais relativos à hiperexpressão desse gene: (1) presença de alterações cromossômicas estruturais ou numéricas aumentadas, incluindo aneuploidia de cromossomo inteiro e alterações a nível de braço cromossômico. O CEP55 acima de um determinado limite foi suficiente para promover a instabilidade cromossômica estrutural e numérica *in vitro* e *in vivo*; (2) comprometimento do ponto de verificação da fase S dependente de CHK1, causando um ciclo mais rápido com o aumento da velocidade da forquilha de replicação e de danos ao DNA, resultando em entrada mitótica prematura; (3) presença de alta frequência de pontes de cromatina na anáfase e formação de micronúcleos durante a segregação cromossômica com saída mitótica tardia devido a microtúbulos estabilizados, gerando instabilidade cromossômica; (4) indução da rápida proliferação por meio da regulação positiva de várias redes de sinalização celular, particularmente a via PI3K/AKT.

Adicionalmente, modelos murinos com TP53 do tipo selvagem exibiam supressão de CEP55 por meio da regulação negativa de PLK1 e, portanto, os cânceres que exibiam

perda de número de cópias alélicas de TP53 apresentaram hiperexpressão de CEP55 comparado com os tumores TP53 diplóides para esse gene. O CEP55 mostrou-se ser um determinante do destino das células aneuplóides durante a mitose alterada e pode ser alvo da inibição da MEK1/2 e PLK1, uma vez que, o uso de inibidores específicos da via PI3K/AKT, MTOR e ERK1/2 reduziu acentuadamente os níveis de CEP55, sugerindo um retorno positivo entre o CEP55 e essas vias de sinalização (SINHA *et al.*, 2019).

A natureza aleatória da instabilidade cromossômica resulta na geração de células com uma grande variedade de cariótipos. Em nível celular, isso pode causar letalidade ou proporcionar às células vantagens malignas, como resistência a medicamentos. Em nível de tumor, isso induz a heterogeneidade do tumor, que por sua vez abre caminho para a expansão clonal das células cancerígenas. O CEP55 protege populações heterogêneas de células aneuplóides e seu *knockout* induz a ativação prematura de CDK1, levando, portanto, à morte celular, facilitando o limiar da apoptose e prevenindo o *Mitotic slippage* (SINHA *et al.*, 2019).

Diante do exposto, abordagens na função CEP55 nas células tumorais podem ser uma nova opção de estratégia terapêutica para atingir vários tipos de cânceres. Estudos adicionais são necessários para determinar, por exemplo, se pequenos peptídeos contendo o domínio GPPX3Y de TEX14 poderiam funcionar como agentes antineoplásicos, capazes de suprimir a proliferação de células cancerígenas por ligação ao CEP55 (IWAMORI *et al.*, 2010).

1.5 Poliploidia

Cada célula somática de mamífero geralmente contém exatamente duas cópias do cromossomos autossômicos. O estado diplóide das células somáticas de mamíferos é guardado por mecanismos de controle, expostos anteriormente, que atuam durante todo o ciclo celular para impedir a ocorrência e/ou proliferação de células com conteúdo de DNA alterado (DAVOLI; DE LANGE, 2011). A inibição ou comprometimento do ciclo celular leva a células poliplóides (TORMOS; TALÉNS-VISCONTI; SASTRE, 2015). Apesar disso, o surgimento de células poliplóides em mamíferos faz parte do desenvolvimento e diferenciação de certos tecidos, apresentando células classificadas como células poliplóides obrigatórias (STORCHOVA; PELLMAN, 2004; ZIMMET; RAVID, 2000).

Assim, células poliplóides estão presentes no coração (cardiomiócitos: 4n), placenta (células gigantes de trofoblasto: 8n a 64n), medula óssea (megacariócitos: 16n a

128n), pâncreas (células acinares: 4n) e fígado (hepatócitos: 4n para 8n) (DONNE *et al.*, 2020). Essas células poliplóides em um organismo diplóide podem fornecer benefícios a curto prazo, mas a longo prazo, embora possam permitir máxima eficiência metabólica, estas parecem ter genomas menos estáveis (STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

Existem duas classes diferentes de células poliplóides: (1) aloploplóides, que combinam dois ou mais genomas relacionados, mas não idênticos, e (2) autoploplóides, que combinam dois ou mais genomas idênticos. As células poliplóides em um organismo diplóide podem se formar por três mecanismos gerais: primeiro, fusão celular; segundo, um mecanismo conhecido como endoreplicação; e terceiro, falha na citocinese ou em outra fase da mitose que resulta em um ciclo celular “abortivo” (DAVOLI; DE LANGE, 2011; STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

Assim, existem duas variantes do processo de endoreplicação: o Endociclo e a Endomitose (DONNE *et al.*, 2020; STORCHOVA; PELLMAN, 2004). O Endociclo compreende na alternância entre as fases G e S que resulta no surgimento de uma células mononucleada poliplóide. Esse ciclo celular aberrante é alcançado pela combinação da oscilação das CDKs da fase S e do impedimento da entrada mitótica, seja por meio da proteólise da ciclina B ou da inibição das ciclinas quinases da fase M. Assim, o evento chave que desencadeia os endociclos é a inibição da entrada na mitose. Essa inibição pode ser mediada pela proteólise das ciclinas mitóticas sob o controle da APC (DONNE *et al.*, 2020).

Na endomitose todas as células pulam algum aspecto da mitose, embora os estágios específicos do ciclo celular perdidos variem de tipo de célula para tipo de célula. Algumas não completam a anáfase e antes disso entram novamente no ciclo celular, tornando-se, assim, células poliplóides. Os megacariócitos são as células que sofrem poliploidização obrigatória mais frequentemente usada em referência à endomitose (ZIMMET; RAVID, 2000).

Donne et al., (2020), por sua vez, também atribuiu a ocorrência da endomitose a partir de problemas que surgem durante a mitose. Por exemplo, ativação prolongada do SAC na metáfase a partir de uma falha na ligação das cromátides irmãs em que uma correta conexão é pré-requisito para o início da anáfase A, seguido de uma degradação progressiva da ciclina B1, outro pré-requisito para o avanço dessa fase. A partir disso, ocorre o processo conhecido como derrapagem mitótica, ou *Mitotic slippage*, na qual a célula “escapa” da mitose e alcança a fase G1.

Storchova *et al.* (2004) utilizou o termo “ciclo celular abortivo”, designando o processo em que algumas células podem "escapar" da parada mitótica, mesmo que o insulto inicial persista, produzindo um célula tetraplóide a partir da divisão celular defeituosa, o que atualmente é chamado de “*Mitotic slippage*”, deslizamento ou derrapagem mitótica (DONNE *et al.*, 2020; SIMONETTI; PADELLA; *et al.*, 2019; SINHA; DUIJF; KHANNA, 2019).

Adicionalmente, segundo Storchova *et al.* (2004), a distinção entre endoreplicação e o ciclo celular abortivo é apenas semântico. O termo "endoreplicação" (que inclui a endomitose) é usado para indicar um programa normal de desenvolvimento que trunca o ciclo celular, produzindo células poliplóides. Por outro lado, a frase "ciclo celular abortivo" (ou derrapagem mitótica) é usada para indicar um ciclo celular parado e muitas vezes descoordenado que ocorre em situações patológicas.

Finalmente, a falha na citocinese geralmente gera um estado binucleado transitório que produzirá uma célula filha em G1 mononucleada com conteúdo de DNA 4N. A falha da citocinese pode ser induzida como resultado de interferências emergentes durante o processo altamente regulado de citocinese (DONNE *et al.*, 2020). Assim, esse tipo de tetraploidização é observado, por exemplo, com o aumento da expressão de um dos reguladores do APC, o MAD2. A hiperexpressão da AURKA em alguns casos devido à amplificação desse gene, é frequente no câncer e também está relacionada a falha na citocinese (DAVOLI; DE LANGE, 2011).

A citocinese é o estágio final da divisão celular que divide o citoplasma igualmente entre duas células filhas geneticamente idênticas. Os eventos de citocinese começam logo após as cromátides irmãs se separarem durante a anáfase, a membrana plasmática começa a entrar onde o corpo médio se forma. A partir disso, uma ponte citocinética se constrói e durante a abscisão (o estágio final da citocinese) há o corte de microtúbulos e essa ponte “rasga” no local da constrição, proporcionando finalmente uma separação física entre as células filhas (BHUTTA; MCINERNY; GOULD, 2014; IWAMORI *et al.*, 2010; JEFFERY *et al.*, 2016; KALIMUTHO *et al.*, 2018).

Assim, quatro eventos devem ocorrer para que a indução da citocinese: (1) estabelecimento do plano de divisão, (2) contração do anel actino-miosina, (3) surgimento do sulco de clivagem e, finalmente, (4) formação da ponte intracelular (DONNE *et al.*, 2020). De modo que, esse processo é rigidamente controlado no espaço e no tempo, acoplado de maneira complexa e intrigante às etapas anteriores da divisão celular. Interferência na progressão desses passos pode levar à falha da citocinese e o surgimento

de células poliplóides (BHUTTA; MCINERNY & GOULD, 2014; IWAMORI *et al.*, 2010; JEFFERY *et al.*, 2016; KALIMUTHO *et al.*, 2018).

Durante a citocinese, portanto, na formação corpo médio, a célula pode enfrentar alguns problemas como (1) montar a maquinaria de abscisão dentro das coordenadas espaço-temporais corretas, (2) ao “cortar” a matriz de microtúbulos, e (3) realizar o evento de abscisão terminal, isto é, clivar a membrana plasmática (NETO; GOULD, 2011). Células com cromossomos atrasados ou fragmentos acêntricos também podem sofrer falha na citocinese porque o sulco da clivagem pode regredir quando a cromatina persiste na zona média, no local de constrição (DAVOLI; DE LANGE, 2011).

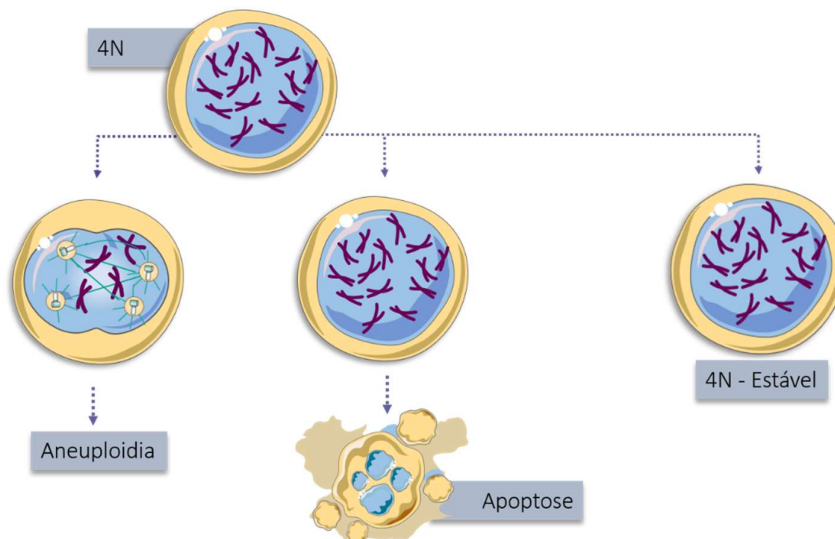
As células cancerígenas tratadas com drogas anti-mitóticas que têm como alvo a dinâmica dos microtúbulos são bloqueadas na metáfase permitindo a ativação do ponto de checagem mitótico. Ativação continuada do checkpoint do fuso mitótico resulta ou na morte celular por meio do fenômeno chamado catástrofe mitótica (ou morte mitótica), levando à remissão do câncer ou na saída da mitose na metáfase por meio da derrapagem mitótica levando à progressão do câncer. Portanto, tem sido sugerido que a poliploidia pode conferir uma vantagem de sobrevivência às células tumorais, contribuindo para a resistência às terapias antitumorais (DE CÁRCER *et al.*, 2018; DONNE *et al.*, 2020).

O ponto de verificação da tetraploidia foi descoberto pela primeira vez em linhagens celulares cancerígenas que haviam escapado da parada mitótica induzida por várias drogas. Inesperadamente, se essas células tetraplóides tivessem p53 funcional, elas ficavam presas na próxima fase G1. No entanto, se as células apresentavam deficiência de p53, elas progrediam através do ciclo celular, sofriam uma mitose anormal devido aos centrossomos extras e tornavam-se aneuplóides. A ligação entre o ponto de verificação de tetraploidia e os genes que são comumente mutados no câncer, como p53, apóia a idéia de que um intermediário tetraplóide pode ter um papel importante no desenvolvimento de cânceres aneuplóides (STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

Alguns destinos das células tetraplóides podem ser destacados: (1) A maioria das células tetraplóides será detectada pelo ponto de verificação de tetraploidia. A ativação desse ponto de verificação resulta em parada no G1, seguida por apoptose. (2) Quando o ponto de verificação da tetraploidia é comprometido (por exemplo, nas células com defeito na p53) essas células passam pela divisão celular. Isso geralmente resulta em aneuploidia e morte celular, mas se isso ocorrer durante a transformação, clones aneuplóides viáveis podem surgir. (3) Em casos raros, uma mitose de redução resulta da segregação de um genoma diplóide em um polo durante uma mitose multipolar, gerando

células diplóides. (4) Em processos normais, como hepatócitos ou megacariócitos, as células se “adaptam” e tem propagação estável como tetraplóides (ou poliplóides), isso ocorre também em muitos tipos de células cancerígenas (Figura 14) (STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

Figura 14: Vários destinos possíveis para as células poliplóides



Legenda: Representação esquemática do destino das células tetraplóides: A maioria das células tetraplóides é detectada pelo ponto de verificação e resulta em parada no G1, seguida por apoptose. Quando o ponto de verificação da tetraploidia é comprometido, essas células passam pela divisão celular. Isso geralmente resulta em aneuploidia e morte celular, mas clones aneuplóides viáveis podem surgir. Em processos normais, como em megacariócitos ou senescência, as células se “adaptam” e tem propagação estável como tetraplóides (ou poliplóides), isso ocorre também em muitos tipos de células cancerígenas

Fonte: Adaptado de Storchova; Pellman (2004).

Assim uma fonte de aneuploidia surge quando uma célula que contém múltiplos centrossomos entra na mitose. Centrossomos extras são freqüentemente encontrados em células neoplásicas e podem refletir uma história anterior de derrapagem mitótica e tetraploidia. Células que possuem mais de dois centrossomos podem formar fusos multipolares transitórios. Se esses defeitos do fuso não forem corrigidos, pode ocorrer uma anáfase multipolar, produzindo três ou mais células filhas altamente aneuplóides (DAVOLI; DE LANGE, 2011; HOLLAND; CLEVELAND, 2009; STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

Isso nos leva à ideia de que algumas células cancerígenas aneuplóides podem se desenvolver por meio de um intermediário tetraplóide, resultado de uma mitose caótica e causando extensa instabilidade genômica. Presumivelmente, a maioria dessas células morreria, no entanto, células com uma vantagem de crescimento acabam surgindo. Neste modelo, a aneuploidia se desenvolve a partir de um evento catastrófico transitório: tetraploidização (DAVOLI; DE LANGE, 2011; HOLLAND; CLEVELAND, 2009; STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

Existem várias vias pelas quais as células podem ganhar ou perder cromossomos durante a mitose: (1) Defeitos na sinalização do ponto de verificação mitótico. (2) Defeitos de coesão. (3) Ligação merotética. (4) Divisões mitóticas multipolares (HOLLAND; CLEVELAND, 2009).

Na primeira via, um SAC enfraquecido pode permitir que as células entrem na anáfase na presença de cromossomos desanexados ou desalinhados e ambas as cópias de um cromossomo podem ser depositadas em uma única célula filha. Na segunda, caso a coesão entre as cromátides irmãs forem perdidas prematuramente ou persistir durante a anáfase, os cromossomos podem ser desregulados. Na terceira, um cinetócoro pode ser ligado aos microtúbulos de ambos os pólos do eixo. Se esses anexos persistirem na anáfase, os pares de cromátides em atraso podem ser desregulados ou excluídos de ambas as células filhas durante a citocinese. Na última, as células com mais de dois centrossomas podem apresentar uma divisão multipolar. Muitas vezes, no entanto, os centrossomas em eixos multipolares se agrupam para permitir que as células se dividam de maneira bipolar. Entretanto, esse agrupamento aumentará a frequência de conexões incorretas. Centrossomas extras são, portanto, capazes de conduzir a desregulação cromossômica por meio de um mecanismo independente de divisões multipolares (HOLLAND; CLEVELAND, 2009).

Dessa forma, as células cancerígenas representam uma classe de células que frequentemente apresenta ploidia alterada. Uma barreira para definir o papel da aneuploidia na biologia do tumor é a complexidade genética das células aneuplóides (HOLLAND; CLEVELAND, 2009; SINHA; DUIJF; KHANNA, 2019). Cada tumor aneuplóide é aneuplóide à sua maneira. O que pode ser explicado pela natureza aleatória da instabilidade genômica que facilita a aquisição de mutações somáticas evolutivas, levando à plasticidade e heterogeneidade do tumor (SINHA *et al.*, 2019). Isso dificulta a identificação de mutações que resultam em aneuploidia e características gerais comuns às essas células (STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

A terapêutica eficaz do câncer deve se basear nas diferenças fisiológicas entre as células cancerígenas e as células normais. Várias estratégias genéticas baseadas no princípio da letalidade sintética foram desenvolvidas para identificar diferenças funcionais entre células cancerígenas e células normais. Assim, a letalidade específica da ploidia possa ser igualmente explorada para identificar novos alvos para o desenvolvimento de drogas antineoplásicas (STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

1.6 Megacariopoiese

Os megacariócitos (MC) são os precursores das plaquetas sanguíneas circulantes, representam uma população celular normal que sofre poliploidização obrigatória por meio de uma variação do ciclo celular chamada endomitose. Entre todos os exemplos de células poliplóides, os MCs são considerados únicos em vários aspectos. (DAVOLI; DE LANGE, 2011; GEDDIS, 2010; STORCHOVA; PELLMAN, 2004; YAGI; ROTH, 2006; ZIMMET; RAVID, 2000).

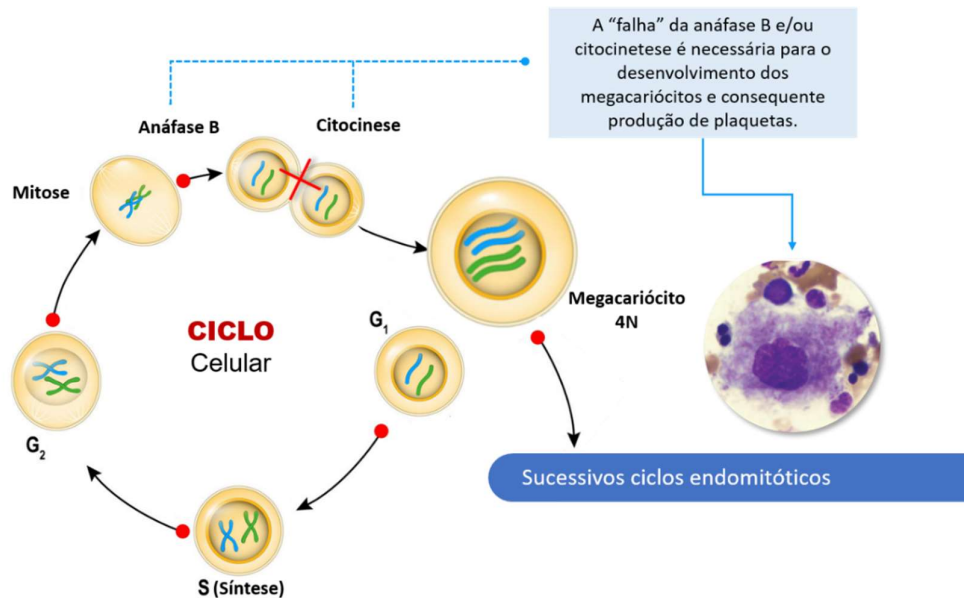
Em algum momento do comprometimento da linhagem, essas células passam de um ciclo celular mitótico para endomitótico, não mais se dividindo, mas realizando sucessivas fases de síntese de DNA sem cariocinese ou citocinese. Esse processo é repetido várias vezes até formar células com alta ploidia, que contêm um único núcleo típico polilobulado. Posteriormente, essa célula cessará completamente a síntese de DNA, passará por um processo de maturação citoplasmática e, eventualmente, fragmentará as plaquetas em circulação (DAVOLI; DE LANGE, 2011; ROY *et al.*, 2001; ZIMMET; RAVID, 2000).

À medida que essas células se tornam progressivamente diferenciadas, promegacarioblastos diplóides dão origem a megacarioblastos tetraplóides e, em seguida, sucessivamente maiores, geram promegariocarócitos e megacariócitos poliplóides. Megacariócitos maduros podem acumular um conteúdo de DNA de 8n, 16n, 32n, 64n e até 128n (conteúdo médio de DNA de 16n) antes de prosseguir com sua maturação final e fragmentação plaquetária. São as maiores células hematopoiéticas da medula óssea chegando a 150 μm ou mais de diâmetro (DONNE *et al.*, 2020; GEDDIS, 2010; TRAKALA *et al.*, 2015; ZIMMET; RAVID, 2000).

O ciclo celular endomitótico dos MCs parece ser quase idêntico a um ciclo proliferativo normal, diferindo apenas que este prossegue e entra na Anáfase A (inicial) e omite a anáfase B (tardia) e citocinese (RAVID *et al.*, 2002; STORCHOVA;

PELLMAN, 2004; TRAKALA *et al.*, 2015). Segundo Davoli (2011), a anáfase e telófase podem até ocorrer, mas a citocinese falha. Essa omissão aparentemente simples implica que o MC ignora vários pontos de verificação que normalmente impedem que as células com cromossomos incompletamente separados ou citocinese aberrante continuem nos ciclos subsequentes (Figura 15) (YAGI; ROTH, 2006).

Figura 15: O ciclo celular endomitótico do megacariócito.



Legenda: A poliploidização programada do megacariócito a partir de sucessivos ciclos que “falham” na anáfase B e/ou citocinese.

Fonte: Adaptado de Davoli & Lange, 2011.

Assim, a endomitose nos megacariócitos é uma mitose incompleta caracterizada por um salto nos estágios tardios da mitose (ROY *et al.*, 2001). Isso parece estar relacionado ao aumento da destruição da ciclina B1 pela via da ubiquitina-proteossomo catalizada pela APC, tanto nas linhagens celulares megacariocíticas poliplóides quanto nos megacariócitos murinos primários com alta ploidia essa destruição acelerada ou prematura da ciclina B permitiria a reentrada na Fase S do ciclo celular. Nas células submetidas a um ciclo celular mitótico, está bem estabelecido que a destruição da ciclina B regula a entrada na anáfase. Esse recurso seria importante em células que sofrem poliploidização pelo ciclo celular da endomitose (ZIMMET; RAVID, 2000).

Outra teoria é que há níveis sub-ótimos de atividade de CDK1/CiclinaB. Embora os aglomerados de cromossomos duplicados se separem temporariamente e se forma uma zona intermediária, o sulco da clivagem regride e todos os cromossomos acabam eventualmente em um único núcleo. Assim, estudos que envolveram a ciclina B1 no processo endomitótico, tem resultados controversos (DAVOLI; DE LANGE, 2011).

Embora a poliploidia seja uma característica definidora dos megacariócitos maduros, o objetivo de adquirir múltiplos complementos cromossômicos é desconhecido (GEDDIS, 2010). A poliploidização aumenta a capacidade metabólica de um tecido, possivelmente canalizando energia para a duplicação de genes e síntese de proteínas em vez da divisão celular e síntese de membranas (SIMONETTI; PADELLA; *et al.*, 2019). Embora os megacariócitos não tenham uma função nutricional, eles podem ser vistos de maneira semelhante como um estoque de componentes necessários para gerar plaquetas (DAVOLI; DE LANGE, 2011).

O nível de poliploidia no MC parece estar correlacionado com a produção de plaquetas (GEDDIS, 2010; YAGI; ROTH, 2006), por exemplo, um megacariócito 32N pode dar origem a 3.000 plaquetas. Supondo que, para cada aumento duplo na ploidia, ocorra um aumento aproximadamente duplo no volume, pelo menos 16 megacariócitos diplóides seriam necessários para fornecer um número semelhantes de plaquetas. Considerando o requerimento diminuído para síntese de membrana em uma única célula 32N versus 16 células diplóides, a poliploidização de megacariócitos pode ser uma maneira eficiente de direcionar a síntese de membrana para a produção de plaquetas e evitar o gasto energético das divisões celulares (DAVOLI; DE LANGE, 2011; RAVID *et al.*, 2002). Adicionalmente, os megacariócitos neonatais são tipicamente de baixa ploidia e podem ter uma capacidade reduzida de produzir plaquetas em relação às suas contrapartes adultas (GEDDIS, 2010; YAGI; ROTH, 2006).

A trombopoietina (TPO) é uma das vias de sinalização de citocinas mais essenciais nos megacariócitos. A TPO foi originalmente identificada como um fator de crescimento crítico para a produção de plaquetas (NISHIKI *et al.*, 2017). Estudos com linhagens celulares indicam que a diferenciação megacariocítica poderia ocorrer sem poliploidização subsequente, mas não vice versa, indicando que os sinais gerados pela TPO para induzir endomitose são sentidos apenas por uma células diferenciada, e que a poliploidização só inicia-se após o comprometimento celular com esta linhagem (RAVID *et al.*, 2002).

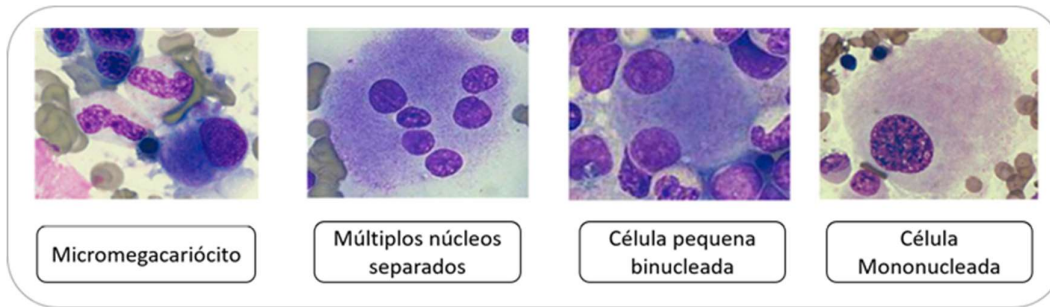
Ainda não está claro, porém, em que ponto exato a célula é receptiva à promoção de sinais endomitóticos. Foi proposto que o efeito da TPO consista em duas fases: a TPO aumenta a proliferação de células CFU-MC primitivas e sua subsequente diferenciação em megacariócito, levando a uma parada temporária na fase G0. A célula agora totalmente diferenciada responderá para TPO com um conjunto de sinais que levariam às células à endomitose e alta ploidia (RAVID *et al.*, 2002).

Um esforço considerável foi realizado na tentativa de relacionar a ploidia dos megacariócitos ao tamanho, número e reatividade das plaquetas. Em resposta à trombocitopenia, os megacariócitos geralmente proliferam e desenvolvem ploidia mais alta. Um primeiro pensamento, então, seria que a ploidia aumentaria junto com a contagem de plaquetas. Sob condições normais, no entanto, verificou-se que a ploidia de megacariócitos em humanos segue uma relação não linear direta com os volumes médios de plaquetas. Como regra geral, a massa de plaquetas (contagem x volume) é mantida em níveis razoavelmente constantes. Também foi relatado que existe uma relação inversa entre o volume plaquetário e o número plaquetário (ZIMMET; RAVID, 2000).

Em resposta à destruição de plaquetas, os volumes de plaquetas começam a aumentar em 8 horas, muito antes do aumento observado no conteúdo de DNA de megacariócitos. Por outro lado, está bem estabelecido que os megacariócitos da medula óssea respondem a alterações na massa de plaquetas circulantes. Reduções crônicas na contagem de plaquetas por mecanismos imunológicos, como na púrpura trombocitopênica imunológica, na maioria dos casos resultam em aumentos na ploidia dos megacariócitos, além de frequência e tamanho. Em resposta a alterações agudas no número de plaquetas, a ploidia dos megacariócitos varia inversamente e proporcionalmente à alteração das plaquetas (ZIMMET; RAVID, 2000).

A linhagem megacariocítica é o marcador mais característico da displasia quando presente. Estes podem ser observados em diferentes morfologias anormais (CAZZOLA; DELLA PORTA; MALCOVATI, 2013) (Figura 16), como hipersegmentação (ou multinucleação), núcleos em forma de haltere, megacariócitos mononucleares (ou hipolobulados) grandes ou pequenos e, particularmente, a presença de micromegacariócitos, são relativamente específicas para mielodisplasia e têm alta reprodutibilidade (ARBER *et al.*, 2016; FOURNIER *et al.*, 2020; MAGALHÃES *et al.*, 2018).

Figura 16: Anormalidades morfológicas na linhagem megacariocítica.



Legenda: Exemplos representativos de anormalidades morfológicas da linhagem megacariocítica.

Fonte: Adaptado de Cazzola; Della Porta; Malcovati, 2013

Assim, em duas *coortes* anteriores, demonstramos que a expressão desregulada do CDC20, seja a nível gênico ou protéico, está relacionada a características importantes da SMD, com destaque para alterações relacionadas à linhagem megacariocítica e a alterações cromossômicas (BORGES et al., 2017; GENGA et al. 2015). Em outro estudo recente, nosso grupo identificou a partir de espectrofotometria de massas a CEP55 entre as proteínas plasmáticas expressas de forma diferencial em medula óssea de pacientes com SMD (dados não publicados). Diante disso e uma vez que o CDC20 e CEP55 são genes controladores centrais do progresso de duas fases críticas para o sucesso da mitose (anáfase e citocinese, respectivamente) ambos foram alvos do presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os níveis de expressão dos genes *CDC20* e *CEP55* em pacientes com diagnóstico de SMD, associando os achados com alterações citogenéticas, variáveis clínicas e laboratoriais e prognóstico.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar os níveis de expressão dos genes *CDC20* e *CEP55* entre indivíduos saudáveis e diagnosticados com SMD;
- Associar os níveis de expressão gênica as características clínico-laboratoriais de pacientes portadores de SMD e às alterações citogenéticas e à evolução para LMA;
- Correlacionar os níveis de expressão gênica entre os genes *CDC20* e *CEP55*;
- Correlacionar os níveis de expressão gênica do *CDC20* e *CEP55* com a expressão de mRNA de outros genes (Banco de dados do Laboratório de Citogenômica do Câncer) relacionados ao ciclo celular, ao reparo do DNA e às polimerases com atividade de translesão.

3. MATERIAIS E METÓDOS

3.1. Seleção de Amostras

Neste estudo foram incluídas 45 amostras de medula óssea (MO) de pacientes com SMD, diagnosticados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde revisado de 2016 (VARDIMAN et al, 2019) e regularmente inscritos no ambulatório de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará HUWC/UFC e Hospital Geral de Fortaleza (HGF) no período de 2008 a 2019. Foram utilizados como controles 5 amostras de medula óssea de pacientes saudáveis, após consentimento informado.

3.2. Aspectos Éticos

A presente pesquisa foi submetida e aprovada (Nº do processo: 1.292.509) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Walter Cantídio, por meio do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) apresentados na sessão apêndice.

Nestes termos, a equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

3.3. Coleta de Amostras

Todas as amostras foram coletadas por médico hematologista experiente. Para a avaliação do Cariótipo por banda G, as amostras foram coletadas em seringa heparinizada. As amostras para a obtenção do *pool* celular foram coletadas em tubos Vacutainer® contendo EDTA. A partir da coleta de 8 ml de medula óssea de pacientes com SMD e indivíduos saudáveis em tubos de vidro Vacutainer® contendo EDTA, foram separados 5 ml para os procedimentos de extração de RNA total a fim de realizar os experimentos de expressão gênica e 03 ml para os procedimentos de Citogenética Clássica.

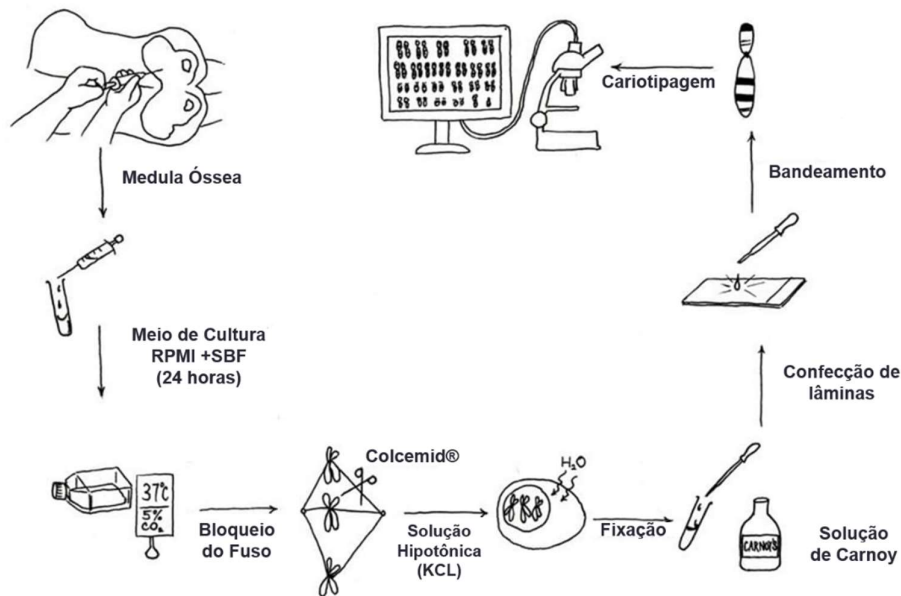
Para o processo de separação das células dos tubos que continham o material medular, realizou-se uma centrifugação a 1811 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foram retirados o sobrenadante que continha o plasma e armazenado em eppendorfs para futuras pesquisas proteômicas. O material restante foi lavado com 1ml de solução de lise (25ml

de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01M) e transferido para um tubo do tipo Falcon de 50mL que continha 24ml de solução de lise. O conteúdo foi agitado lentamente, deixado em banho de gelo por 15 minutos e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250µL de PBS e, posteriormente, 750µL de *Trizol LS Reagent*® (Invitrogen, EUA). O material foi homogeneizando com pipeta até dissolução completa. Após este procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80°C.

3.4. Cariótipo por Banda G

A técnica de citogenética foi realizada a partir dos protocolos estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará, segundo a técnica descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (PINHEIRO et al, 2009). A amostra de medula é colhida em tubos estéreis contendo heparina e são divididas em dois frascos contendo 8mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0), 2 mL de soro fetal bovino e 100µL de streptomicina e penicilina. O material foi cultivado por 24 horas em estufa à 37°C. Em seguida, adiciona-se 70µL de colchicina (Colcemid®) por 30 minutos. O material é então centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075M por 20 minutos. Antes de centrifugar novamente, é adicionado 0,5mL de Carnoy (solução 3:1 de metanol e ácido acético) e homogeneizado. Após a centrifugação, o material foi lavado por até 3 vezes em solução de Carnoy. Para a confecção das lâminas, o material foi gotejado em lâminas, “envelhecidas” em placa e o bandeamento é realizado pela técnica de tripsina e as lâminas coradas com corante Wright. Para cada paciente, são analisadas 20 metáfases e todas capturadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem: CytoVision®. Os resultados das análises citogenéticas de medula óssea foram confirmados segundo os critérios estabelecidos pelo Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (Figura 17) (MCGOWAN-JORDAN, 2016).

Figura 17: Representação da Metodologia de Citogenética por Banda-G



Legenda: Para realização da citogenética a MO permanecerá em cultura de 24 horas em meio contendo RPMI e SBF à 37°C em CO₂ a 5%. Após o tempo de incubação, a amostra passará pelo bloqueio do fuso mitótico a partir do Colcemid®, e em seguida será realizado a lise do citoplasma a partir de uma solução hipotônica (KCL), após isso, e antes da confecção das lâminas será realizado a fixação do material com três lavagens com o fixador Carnoy (3 Metanol:1 ácido acético). Após leitura de lâminas são capturadas 20 metáfases para análise.

Fonte: Adaptado Wan, T., 2016.

3.5. Análise de Expressão do mRNA por RT-qPCR

3.5.1 Extração do RNA total

A extração de RNA das células do pool medular dos pacientes com SMD e dos controles saudáveis foi realizada a partir da utilização do Trizol LS® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Em cada 1mL de Trizol LS Reagente® deve-se encontrar 10⁶ células armazenadas, sendo assim, foram adicionados 200µL de clorofórmio para desproteinização e 10µL de glicogênio, em seguida, foram homogeneizados em vórtex e centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado de cada amostra e transferido para novos tubos, seguidos de precipitação com 400µL de isopropanol e incubados por 60 minutos a -20°C. Após esse período, foi realizada outra centrifugação com as mesmas especificações, porém pelo dobro do tempo (30 minutos), o sobrenadante foi depois descartado por inversão e, após o pellet ter secado, ele foi diluído em água livre de RNase. Por fim, para a quantificação

das amostras, realizou-se leituras espectrofotométricas em NanoDrop™ nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm, obtendo suas correlações e concentrações adquiridas.

3.5.2 Síntese de cDNA

O experimento seguiu as recomendações do fabricante do kit para Transcrição Reversa da Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®). Para cada reação, foram utilizados uma quantidade otimizada de RNA total para uma concentração final de 1000 ng. Para cada reação, utilizou-se de 1,0 µL de buffer, 0,4 µL de dNTP, 1,0 µL de Random Primers, 0,625 µL de Multiscribe Reverse Transcriptase™ e 1,0 µL de RNase Inhibitor. As quantidades que foram citadas tiveram que ser multiplicadas pelo número total de amostras com RNA total para a produção de um “Mix” de reação. Os volumes de cada microtubo foram completados com água ultrapura até o volume final padrão de 20 µL. Os tubos foram fechados e submetidos à agitação com spin por aproximadamente 10 segundos. Por fim, as amostras foram submetidas ao termociclador, onde foram realizados os seguintes ciclos: Desnaturação a 25°C por 10 minutos; Anelamento a 37°C por 120 minutos; Extensão a 85°C por 5 minutos; e Finalização a 4°C.

3.5.3 RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)

A quantificação da expressão gênica dos dois genes avaliados nesse estudo (Tabela 2) foi realizada a partir da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) realizado no aparelho *7500 Real-Time PCR System*® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). As reações foram preparadas utilizando o Kit *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) otimizado para reações com sonda *TaqMan assay*® (Tabela 3).

O armazenamento e os preparados foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, exceto pelo volume final de cada reação que foi otimizado em 5 µL. Para cada reação foram utilizados 2,5 µL de TaqMan PCR Master Mix, 0,25 µL de sonda TaqMan assay®, 1,0 µL de água ultrapura e 1,25 µL de cDNA. Na preparação das reações foram utilizadas placas de polipropileno para 96 reações (MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) recobertas com adesivos para microplacas ópticas resistentes a álcool e a altas temperaturas (Optical Adhesive film,

Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). Após o preparo dos poços, as placas foram centrifugadas por 1 minuto a 4500 rpm. As condições para a PCR foram: pré-aquecimento a 50° C por 2 minutos, ativação da polimerase a 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação (15 segundos a 95° C) e anelamento e extensão (60 segundos a 60°C. Em todas as etapas, as amostras estavam imersas no gelo com pouca exposição à luz.

Tabela 2: Sondas utilizadas na reação de RT-qPCR

Genes Normalizadores	CÓDIGO DE REFERÊNCIA (Applied Biosystems)
<i>B2M</i> (β2-Microglobulina)	Hs99999907_m1
<i>UBC</i> (Ubiquitina C)	Hs00824723_m1
Genes estudados	
<i>CEP55</i> (proteína centrossomal 55)	Hs01070181_m1
<i>CDC20</i> (proteína do ciclo de divisão celular 20)	Hs00426680_mH

Fonte: Próprio autor.

Para cada amostra, foi realizada uma duplicata e foram consideradas para análise somente amostras cujas diferenças de amplificação não excederam a 0,8 ciclos ($\Delta Cq \leq 0,8$) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Não foram consideradas as duplicatas das amostras que apresentaram diferenças maiores que um ciclo e meio, mesmo após repetição do experimento. Foram realizados controles negativos (NTC) das reações para todos os genes estudados, sendo que para estas reações foram adicionados 1,25 µL de água no lugar da amostra de cDNA. Todas as reações que mostraram amplificação para qualquer um dos controles negativos foram desconsideradas.

Além disso, foi utilizado para cada placa e por cada gene estudado uma amostra de referência (REF), também em duplicata, com o intuito de padronizar e validar todas as placas do experimento. Tal amostra de referência foi composta por cDNA originado de mRNA de um pool de duas linhagens celulares oriundas de tumores humanos disponibilizados pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FRMP/USP.

Foram utilizados três genes endógenos para confirmar a estabilidade dos níveis de expressão gênica: β2-microglobulina (*B2M*), Ubiquitina C (*UBC*) e potencial do receptor transitório humano 1 (*HTRP1*). Foi calculado o desvio padrão de cada endógeno com base em valores absolutos (*Cq* - quantification cycle) para a escolha do par de genes de referência mais estável. Aqueles que obtiveram o menor valor de desvio padrão foram considerados os mais estáveis. Após a análise do desvio padrão, foi realizado um cálculo

de coeficiente de correlação de Pearson para cada par de genes de referência candidatos. Em seguida, foi feita a média geométrica de todos os genes, conhecida como média de tendência central (INDEX), e feito correlação de Pearson de cada gene, separadamente, com o INDEX obtido. Os genes de referência que apresentaram menor valor de desvio padrão e maior correlação entre si e com o valor INDEX ($r > 0,7$) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) foram considerados os mais estáveis.

Portanto, após os cálculos realizados, os genes mais estáveis nas amostras de cDNA utilizados foram a *UBC* e o *B2M*. Os resultados foram analisados por meio do software *Sequence Detection System v1.3* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para a obtenção dos valores de *quantitative cycle* (*Cq*). Foi estabelecido um *threshold*, no qual os valores de *Cq* foram fornecidos pelo software do aparelho 7500 *Real-Time PCR System*® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA) para a realização das análises estatísticas. Em seguida, os dados foram exportados para planilhas do software Microsoft Excel (formato .xlsx) para os cálculos de ΔCq e de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ tanto dos genes endógenos quanto dos genes alvos (LIVAK *et al.*, 2001). A nomenclatura utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi padronizada e seguida de acordo com o MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009). Sabe-se que os valores em *outliers* frente ao amostras avaliadas podem apresentar algum tipo de interferência na precisão correta das análises realizadas. Por isso, foi necessário retirar do estudo as amostras que se distanciavam em seus desvios padrões, a fim de determinar a qualidade, integridade e estabilidade dos níveis de expressão. Diante disso, o estudo se iniciou com 70 amostras de cDNA, mantendo-se no total 45 amostras para prosseguimento das análises estatísticas.

3.6 Variáveis Analisadas

- Grupo: Caso e Controle;
- Sexo: Feminino e Masculino;
- Idade: ≤ 60 anos, $>60 - \leq 70$ anos, >70 anos;
- Diseritropoiese: Ausência e Presença;
- Disgranulopoiese: Ausência e Presença;
- Dismegacariopoiese: Ausência e Presença;
- Faixas de porcentagem de sideroblastos em anel: 0, 1-14% e $>15\%$;

- Dependência Transfusional: Ausência e Presença [utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI *et al.*, 2005)];
- Cariótipo: Normal e Alterado;
- Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R): $\geq 10\text{g/dL}$, $8 < 10\text{g/dL}$ e $< 8\text{g/dL}$;
- Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) (IPSS-R): ≥ 800 por mm^3 e < 800 por mm^3 ;
- Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R): ≥ 100.000 por mm^3 , $50.000 - < 100.000$ por mm^3 e ≤ 50.000 por mm^3 ;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo e baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Classificação do número de citopenias no sangue periférico: nenhuma, 1 citopenia, 2 citopenias e 3 citopenias;
- Quanto a classificação da OMS (2016): SMD-DU (SMD com Displasia de Única Linhagem), SMD-DM (SMD com Displasia de Múltipla Linhagem), SMD-EB (SMD com Excesso de Blastos), SMD-SA (SMD com Sideroblastos em Anel);
- Cariótipo (Aneuploidia): normal, alterado não aneuplóide e alterado aneuplóide;
- Cariótipo (Alteração no cromossomo 7): normal, alterado com $-7/7q$ e alterado sem $-7/7q$;
- Cariótipo (Alteração no cromossomo 5): normal, alterado com $-5/5q$ e alterado sem $-5/5q$;
- Evolução para LMA: Ausência e Presença;

3.7. Análise Estatística

Os resultados gerados pelas análises de expressão gênica foram avaliados pelos resultados de cada Cq (quantitative cycle) de cada amostra de cDNA (em duplicatas). Em seguida, para normalizar os valores de Cq com o objetivo diminuir as diferenças geradas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o Cq de uma amostra foi subtraído pela média geométrica dos Cq's dos genes constitutivos utilizados (UBC e GAPDH) da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e, posteriormente, o $2^{-\Delta\text{Cq}}$ (LIVAK *et al.*, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Os dados sobre os níveis de expressão gênica (valores de $2^{-\Delta Cq}$) foram expressos em média \pm desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre o nível de expressão dos genes frente cada variável analisada. O nível de significância estatística utilizado foi de $p < 0,05$ e as análises foram efetuadas com recurso do software SPSS para Windows (versão 21.0) e GraphPad Prism 8.

Como este estudo apresentou número de amostras menor que 50 casos, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada se apresentavam com distribuição normal (dados paramétricos, com grupos com menos de 50 casos). Os valores de *outliers* foram retirados do estudo, porque apresentavam valores contrastantes com os demais. A partir da normalização dos casos, foram realizados testes paramétricos por meio de testes T de Student, quando se comparavam médias entre dois grupos, o teste de ANOVA one-way quando se comparavam três ou mais grupos e ANOVA two-way para avaliar não só o efeito principal de cada variável independente, mas também se existe alguma interação entre elas.

O pós-teste (*post-hoc*) para o ANOVA foi definido pela análise de homogeneidade de variâncias por meio do teste de Levene. Se a homogeneidade fosse confirmada (p -valor $\geq 0,05$), o pós-teste utilizado foi o teste de Tukey. Se não tivesse homogeneidade (p -valor $< 0,05$), o pós-teste foi o teste de Games-Howell.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da População

Dos 45 pacientes com SMD incluídos neste estudo, 23 indivíduos (51,1%) foram do sexo feminino e 22 indivíduos (48,88%) foram do sexo masculino. Com relação à idade dos pacientes, a média foi de 67 anos e a mediana 70 anos (mínimo de 42 anos e máximo de 94 anos) com uma predominância de pacientes com idade superior a 60 anos em 64,4% (29/16) dos casos.

Dos resultados obtidos de 23 biópsias de medula óssea desses pacientes, 18 (78,3%) apresentaram medula hiperclular, 2 (8,7%) hipocelular e 03 (13%) normocelular, com predomínio de pacientes com ausência de fibrose: 18 com ausência (78,3%) e 5 com fibrose (21,7%). Não foi possível ter acesso aos resultados de biópsias dos restantes dos pacientes (Tabela 3).

Dos achados da medula óssea referentes ao mielograma de 45 pacientes, observou-se predomínio de displasia da linhagem eritróide, em 38 (84,4%) pacientes, seguida por 24 (53,3%) pacientes apresentando dismegacariopoiese e 22 (48,9%) pacientes com disgranulopoiese. Quanto à porcentagem de blastos, 15 (33,3%) pacientes estavam inclusos na faixa de $\leq 2\%$, seguido de 14 na faixa $>10\%$ (31,1%), 12 (26,7%) na faixa de 5-10% e 4 (8,9%) na faixa de >2 a $<5\%$ (Tabela 3).

Quanto à porcentagem de sideroblastos em anel, em 16 pacientes (47,05%) esse achado não foi observado e em 18 (52,95%) havia presença de sideroblastos ($\geq 15\%$) (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência das variáveis clínicas dos pacientes.

Variáveis	Número de Pacientes	Porcentagem
IDADE		
≤ 60	16	35,6%
$>60-70$	6	13,3%
$>70-80$	13	28,9%
>80	10	22,2%
HEMOGLOBINA (g/dL)		
≥ 10	09	20,0%
$8 < 10$	16	35,6%
< 8	20	44,4%
Contagem absoluta de neutrófilos (ANC)		
≥ 800	37	82,2%
< 800	8	17,8%
PLAQUETAS		

≥ 100	21	46,7%
50-<100	6	13,3%
<50	18	40,0%
BLASTOS MO		
≤ 2%	15	33,3%
>2% - <5%	04	8,9%
5%-10%	12	26,7%
>10% - <20%	14	31,1%
SIDEROBLASTOS EM ANEL		
0	16	47,05%
>1-<15%	0	0%
≥ 15%	18	52,95%
CELULARIDADE MO		
Hipocelular	02	8,7%
Normocelular	03	13%
Hiper celular	18	78,3%
FIBROSE MEDULAR		
Presença de fibrose	05	21,7%
Ausência de fibrose	18	78,3%

Todos os 45 pacientes avaliados foram classificados de acordo com a OMS 2016, sendo 44 (97,8%) pacientes classificados como SMD primária, 1 (2,2%) como SMD relacionada à terapia. Dentre os pacientes classificados como SMD primária, o subtipo mais frequente foi SMD-SA-DM com 15 (33,4%) pacientes, seguida pelos subtipos, SMD-EBI e SMD-EBII, com 12 (26,7%) e 11 (24,4%) pacientes, respectivamente, SMD-DM com 5 (11,1%) pacientes, SMD-DU com 1 caso (2,2%) e SMD secundária com 1 (2,2%) paciente (Tabela 4).

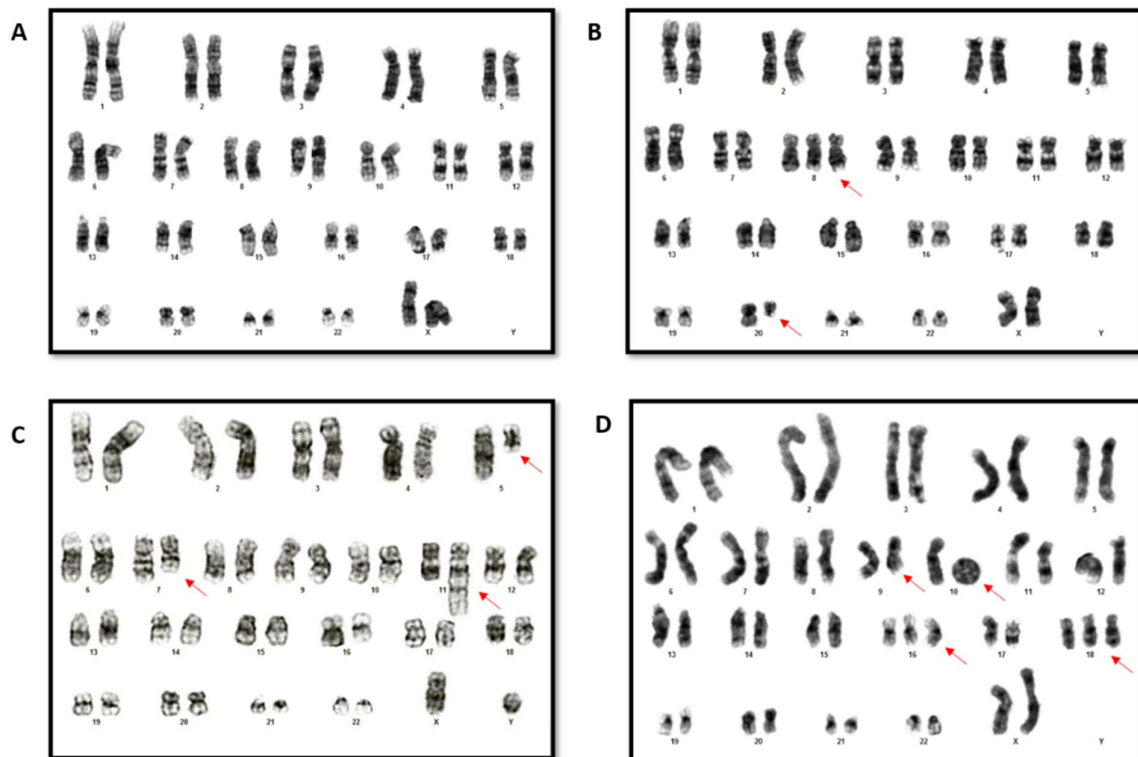
Tabela 4: Caracterização dos pacientes segundo a classificação da OMS 2016

Variáveis	Número de Pacientes	Porcentagem
Classificação da OMS		
SMD-DU (SMD com displasia em única linhagem)	1	2,2%
SMD-DM (SMD com displasia em múltiplas linhagens)	5	11,1%
SMD-SA-DU (SMD com sideroblastos em anel com displasia em única linhagem)	0	0%
SMD-SA-DM (SMD com sideroblastos em anel com displasia em múltiplas linhagens)	15	33,3%
SMD-EBI (SMD com excesso de blastos I)	12	26,7%
SMD-EBII (SMD com excesso de blastos II)	11	24,5%
tSMD (SMD secundária)	01	2,2%
Formas da SMD		
Iniciais	21	47,62%
Avançadas	24	52,38%

A citogenética por banda G foi realizada para 45 pacientes, sendo que 39 (86,7 %) pacientes apresentaram resultado e 6 (13,3%) pacientes apresentaram ausência de metáfases (Tabela 5). Dos 39 pacientes com resultado citogenético, 22 (56,4%) apresentaram cariótipo normal, frente a 17 (43,6%) pacientes com alterações, sendo que 5 (12,8%) pacientes apresentaram alteração relacionada ao cromossomo 5 (-5/5q-), 4 (10,3%) pacientes apresentaram alteração relacionada ao cromossomo 7 (-7/7q-) e 12 (30,7%) dos pacientes apresentaram cariótipo com aneuploidia (Tabela 5). A Figura 19 exemplifica alguns resultados da análise citogenética encontrados nesse estudo.

Quanto ao número de alterações, 8 (20,5%) pacientes apresentaram apenas 1 alteração, 6 (15,4%) pacientes apresentaram 2 alterações e 3 (6,7%) pacientes apresentaram cariótipo complexo, com 3 ou mais alterações em um mesmo clone (Tabela 5). Quanto ao prognóstico, estabelecido pelo IPSS-R (GREENBERG et al, 2012) houve um predomínio de pacientes com prognóstico favorável 28 casos (71,8%) (Tabela 5).

Figura 18: Exemplos de cariótipos analisados no estudo



Legenda: A. Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo normal 46, XX[20]. B. Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo alterado com trissomia do cromossomo 8 e deleção do cromossomo 20 C. Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo complexo com del(7q), del(5q) e add(11) D. Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo complexo com cromossomo 10 em anel, deleção 9q, trissomia dos cromossomos 16 e 18.

Tabela 5: Caracterização da citogenética e impacto prognóstico.

Variáveis	Pacientes	Porcentagem
Cariótipo (Normal/Alterado)		
Normal	22	56,4%
Alterado	17	43,6%
Cariótipo (Aneuploidia)		
Normal	22	56,4%
Alterado Aneuplóide	12	30,8%
Cariótipo (Deleção do 5q)		
Normal	22	56,4%
Alterado com deleção do 5q	06	15,4%
Alterado sem deleção do 5q	11	28,2%
Cariótipo (Deleção do 7q)		
Normal	22	56,4%
Alterado com deleção do 7q	03	7,7%
Alterado sem deleção do 7q	14	35,9%
Cariótipo (Alterações)		
Normal	22	56,4%
1 alteração	08	20,5%
2 alterações	06	15,4%
3 ou mais alterações (Complexo)	03	6,7%
Prognóstico segundo o IPSS-R		
Favorável ou Muito favorável	28	71,8%
Intermediário	06	15,4%
Desfavorável ou Muito desfavorável	05	12,8%

Quanto à sobrevida dos pacientes, obtivemos informação sobre o seguimento de 12 dos pacientes, destes, 06 pacientes foram a óbito. Quanto à evolução para LMA, obtivemos informação de 22 pacientes, destes 04 (18,18%) pacientes evoluíram para LMA.

Tabela 6: Descrição clínica dos pacientes

PCT	SEXO	IDADE	CELULARIDADE	CARIÓTIPO	OMS 2016	IPSS-R	EV. LMA
1	M	68	HIPERCELULAR	AUSENCIA DE METAFASE	SMD- EB II	ALTO RISCO	NAO
2	F	82	HIPERCELULAR	46,XX[5]	SMD- SA- DM	MUITO BAIXO	NAO
3	M	74	HIPERCELULAR	46,XY[6]	SMD- SA- DM	BAIXO RISCO	NAO
4	F	44	DNI	46,XX[20]	SMD- EB I	ALTO RISCO	DNI
5	M	73	DNI	AUSENCIA DE METAFASE	SMD- EB II	DNI	DNI
6	F	76	DNI	46,XX[15]	SMD- SA- DM	BAIXO RISCO	NÃO
7	M	89	DNI	46,XY,t[5;19](q13.2;q13.4)[3]/46,XY,t[5;19](q13.2;q13.4),t(8;21)(q21.3;q22.12)[3]/46,XY,del(X)(q21),t(5;19)(q13.2;q13.4),t(8;21)(q21.3;q22.12)[5]/46,XY[9]	SMD- EB II	MUITO ALTO RISCO	SIM
8	M	58	HIPERCELULAR	46,XY,del(5)(q32)[3]/46,XY,del(5)(q32),del(7)(q36)[3]/46,XY,-5,+mar[9]/46,XY[7]	SMD- EB I	ALTO RISCO	DNI
9	M	55	HIPERCELULAR	45,XY,-7[15]/46,XY,-7,+mar[5]	SMD- EB II	ALTO RISCO	SIM
10	F	42	DNI	46,XX[20]	SMD- EB I	ALTO RISCO	DNI
11	M	82	HIPERCELULAR	46,XX[20]	SMD- SA- DM	BAIXO RISCO	NÃO
12	M	84	DNI	46,XY[20]	SMD- EB I	ALTO RISCO	DNI
13	F	79	DNI	46,XX[12]	SMD- EB II	ALTO RISCO	DNI
14	M	75	DNI	92,XXYY[4]	SMD- EB I	ALTO RISCO	DNI
15	M	55	DNI	45,X,-Y[15]/45,X,-Y,del(5)(q32)[3]/46,XY[2]	SMD- EB II	ALTO RISCO	NAO
16	F	81	HIPERCELULAR	46,XY[4]	SMD- EB II	ALTO RISCO	DNI
17	F	93	DNI	46,XX,+8[12]/46,XX[8]	SMD- EB I	ALTO RISCO	DNI
18	F	80	HIPERCELULAR	46,XX[20]	SMD- SA- DM	BAIXO RISCO	NAO
19	F	77	DNI	46,XX[20]	SMD- EB I	ALTO RISCO	NAO
20	F	82	DNI	47,XX,+8[9]/47,XX,+8,del(20)(q12)[5]/46,XX[6]	SMD- SA- DM	DNI	DNI
21	M	79	DNI	46,XY[20]	SMD- EB I	DNI	NAO
22	F	42	NORMOCELULAR	AUSENCIA DE METAFASES	SMD- SA- DM	MUITO BAIXO	NAO

23	M	91	DNI	46,X-Y[4]/46,XY[16]	SMD- SA- DM	BAIXO RISCO	SIM
24	M	58	HIPOCELULAR	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	SMD- SA- DM	BAIXO RISCO	SIM
25	M	79	HIPERCELULAR	AUSENCIA DE METAFASE	SMD-EB I	ALTO RISCO	NAO
26	F	72	DNI	AUSENCIA DE METAFASE	SMD- EB II	ALTO RISCO	DNI
27	F	83	NORMOCELULAR	46,XX[20]	SMD-EB I	ALTO RISCO	NAO
28	F	59	HIPERCELULAR	46,XX[10]	SMD- SA- DM	BAIXO RISCO	NAO
29	M	60	HIPERCELULAR	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	SMD-SA-DM	BAIXO RISCO	NAO
30	F	44	DNI	46,XX[20]	SMD- EB II	ALTO RISCO	DNI
31	F	46	HIPERCELULAR	46,XX[20]	SMD-DM	BAIXO RISCO	NAO
32	F	70	DNI	48,XX,del(9)(q22),r(10)(p15q26.3),+16,+18[15]/46,XX[5]	t-SMD	ALTO RISCO	NAO
33	M	52	DNI	46,XY,del(7)(q31)[3]/45,XY,- 5,del(7)(q31)[5]/46,XY,del(5)(q15),del(7)(q31)[8]46,XY,del(7)(q31),ad d(11)(q24)[4]/46,XY,del(5)(q15),del(7)(q31),add(11)(q24)/46,XY[5]	SMD-EBI	ALTO RISCO	SIM
34	M	62	HIPERCELULAR	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	SMD- EB II	ALTO RISCO	NAO
35	F	76	HIPERCELULAR	46,XX[20]	SMD- SA- DM	ALTO RISCO	NAO
35	F	64	HIPOCELULAR	46 XX [10]	SMD-DM	BAIXO RISCO	NAO
37	M	70	HIPERCELULAR	46,XY[20]	SMD-SA-DM	BAIXO RISCO	NAO
38	M	81	DNI	46,XY[20]	SMD- EB II	ALTO RISCO	NAO
39	F	48	DNI	46,XX[4]	SMD-DU	BAIXO RISCO	NAO
40	F	76	HIPERCELULAR	47,XX,+22[4]/46,XX[16]	SMD-DM	BAIXO RISCO	SIM
41	M	44	NORMOCELULAR	46,XY,del(5)(q15q33), del(17)(p11.2)[7]/46,XY[13]	SMD-DM	BAIXO RISCO	DNI
42	F	47	DNI	47,XX,+6[3]/46,XX[17]	SMD-DM	BAIXO RISCO	NAO
43	M	71	HIPOCELULAR	46,XY[20]	SMD- EB I	ALTO RISCO	NAO
44	M	92	DNI	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[13]	SMD-SA-DM	BAIXO RISCO	NAO
45	F	70	HIPERCELULAR	AUSÊNCIA DE METÁFASE	SMD-SA-DM	BAIXO RISCO	DNI

Legenda: M (Masculino), F (Feminino), OMS (Organização Mundial de Saúde), IPSS (Sistema Internacional de Score Prognóstico), DT (Dependência Transfusional), Ev.LMA (Evolução para Leucemia Mielóide Aguda), CRDU (Citopenia Refratária com Displasia em Única linhagem), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), CRDM (Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas linhagens), AREB I (Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo I), AREB II ((Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo II), t-SMD (SMD relacionada a terapia), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica). DNI (Dados não informados).

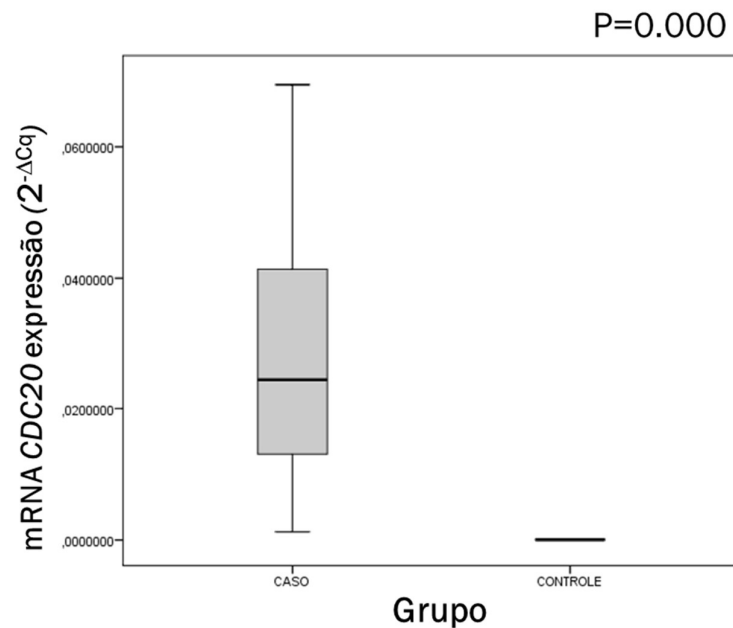
4.2 Análise de expressão gênica por qPCR

4.2.1 Análise da expressão do gene *CDC20*

4.2.1.1 Expressão do gene *CDC20* em pacientes com SMD e controles saudáveis

Ao avaliar a relação *CDC20* em pacientes com SMD e controles, verificou-se que houve aumento dos níveis de *CDC20* no grupo caso em relação ao grupo controle ($p=0.000$) (Figura 19).

Figura 19: Níveis de expressão gênica do *CDC20* em indivíduos saudáveis e pacientes com SMD.



Fonte: Próprio autor

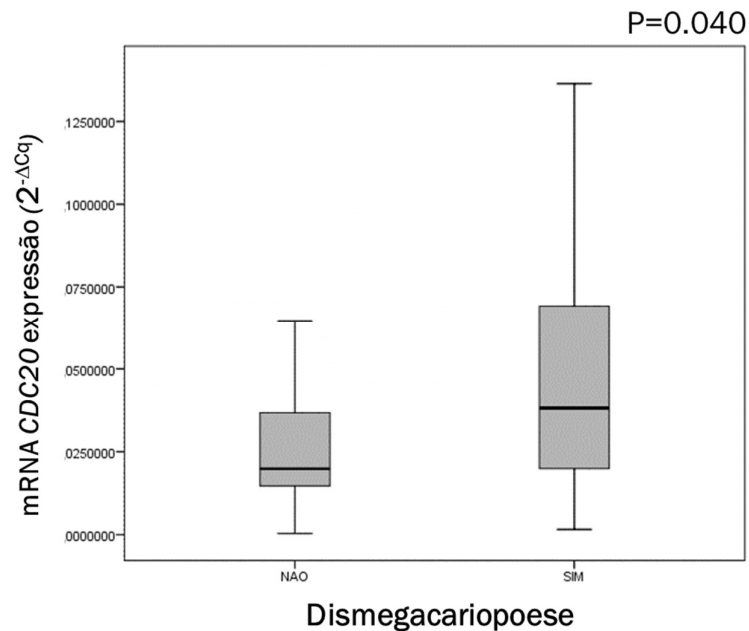
<i>CDC20</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>CDC20</i> $2^{-\Delta Cq}$)</i>						
	<i>GRUPO</i>	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor
	<i>Controle</i>	.000054720	.0000349322	.0221712721	.0344650435	.003	.000
	<i>Caso</i>	.028372878	.0199731050				

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

4.2.1.2 Expressão do gene *CDC20* em relação a variável dismegacariopoiese

Com relação ao setor megacariocítico, observamos que os níveis de *CDC20* apresentavam-se aumentados nos pacientes com presença de Dismegacariopoiese ($p=0,040$) (Figura 20).

Figura 20: Níveis de expressão gênica do *CDC20* frente a variável Dismegacariopoiese.



Fonte: Próprio autor

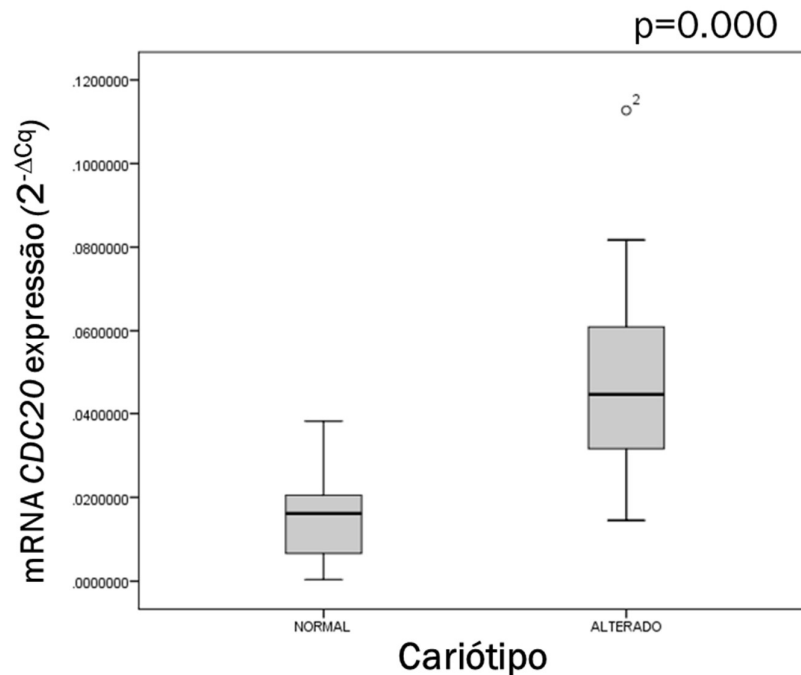
<i>CDC20</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CDC20 2^{-ΔCq})</i>						
	<i>Dismegacariopoiese</i>	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor
<i>Não</i>		,027339808	,0194841514				
<i>Sim</i>		,048098336	,0392088989	-,0404752376	-,0010418191	,013	,040

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

4.2.1.3 Expressão do gene *CDC20* em relação a variável cariótipo normal e alterado.

Quanto à presença de cariótipo normal e alterado, observou-se que houve aumento da expressão de *CDC20* naqueles pacientes com cariótipo alterado quando comparado aos pacientes com cariótipo normal ($p=0,000$) (Figura 21).

Figura 21: Níveis de expressão gênica do *CDC20* em relação a variável Cariótipo normal e alterado.



Fonte: Próprio autor

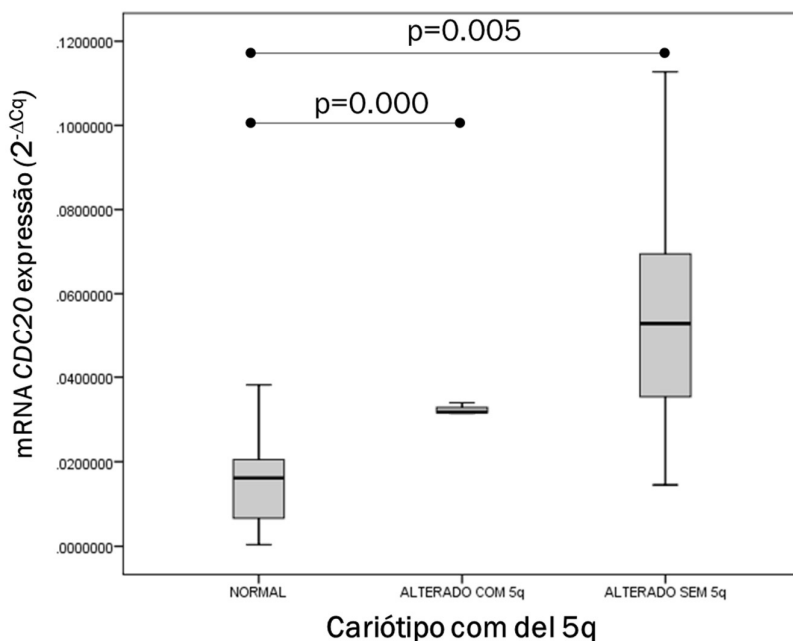
<i>CDC20</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CDC20 $2^{-\Delta Cq}$)</i>						
	<i>Cariótipo</i>	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor
	Normal	,015922046	,0110583253	-,0467673450	-,0160192391	,011	,000
	Alterado	,047315338	,0265636450				

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

4.2.1.4 Expressão do gene *CDC20* em relação a cariótipo com e sem deleção 5q.

Ao analisarmos a presença de deleção do 5q ao cariótipo, observamos que os níveis de *CDC20* apresentavam-se diminuídos nos pacientes com cariótipo normal quando comparados aqueles com cariótipo alterado com a deleção do 5q ($p= 0,000$) e quando comparados aqueles com cariótipo alterado sem a deleção do 5q ($p= 0,005$) (Figura 22).

Figura 22: Níveis de expressão gênica do *CDC20* frente ao Cariótipo com e sem deleção 5q



Fonte: Próprio autor

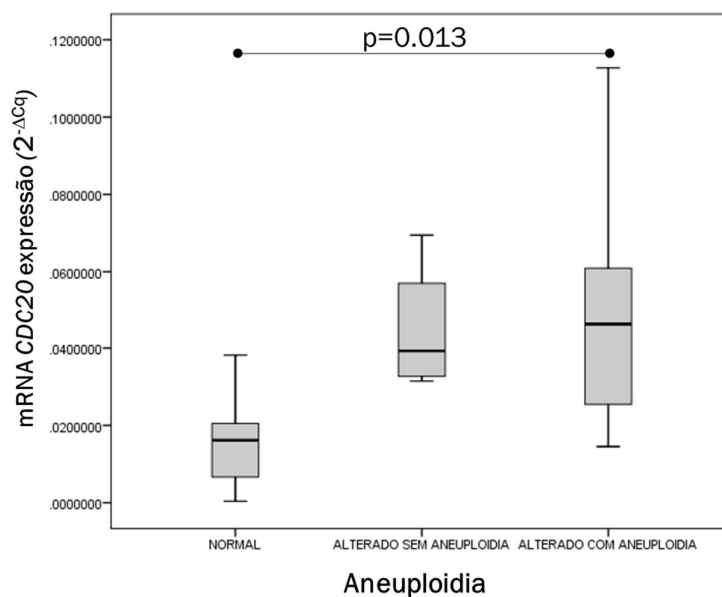
<i>CDC20</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CDC20 2^{-ΔCq})</i>							
<i>Cariótipo</i>	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova	Teste de Levene	Games-Howell	
<i>Normal</i>	.016169983	.0108421196	.010120245	.019990793	,000	,003	,000/,005	
<i>Alterado com 5q</i>	.031744937	.0013630549	.028994440	.035766472				,000
<i>Alterado sem 5q</i>	.052931665	.0295047509	.033776048	.075988903				,005

‡ ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas.

4.2.1.5 Expressão do gene *CDC20* em relação ao cariótipo normal, cariótipo alterado com e sem aneuploidia

Quanto ao cariótipo, observou-se que os níveis de *CDC20* estão aumentados nos pacientes com cariótipo alterado com aneuploidia em comparação com os que apresentavam cariótipo normal ($p = 0,013$) (Figura 23).

Figura 23: Níveis de expressão gênica do *CDC20* frente a Cariótipo normal, Cariótipo alterado com e sem aneuploidia



Fonte: Próprio autor

CDC20 Nível de expressão (Expressão Gênica do *CDC20* 2^{-ΔCq})

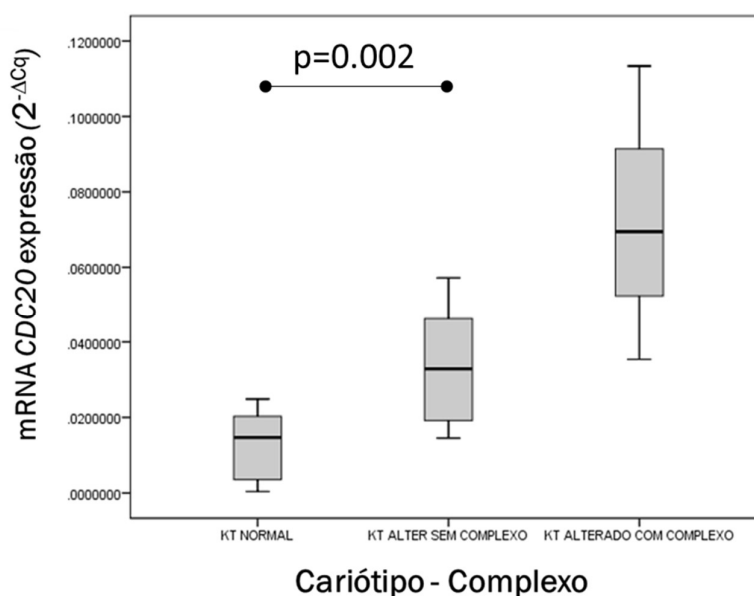
<i>Cariótipo</i>	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova	Teste de Levene	Games-Howell
<i>Normal</i>	0,015922046	0,0110583253	0,010592104	0,021251988			,013
<i>Alterado sem Aneuploidia</i>	0,044854505	0,0173549876	0,017238846	0,072470163	,000	,018	-
<i>Alterado com Aneuploidia</i>	0,048210	0,0299034503	0,028120775	0,068299597			,013

‡ ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas.

4.2.1.6 Expressão do gene *CDC20* em relação à presença de cariótipo complexo

Quanto ao cariótipo, observou-se que níveis de *CDC20* estão aumentados em pacientes com cariótipo alterado não complexo em comparação com os que apresentavam cariótipo normal ($p= 0.002$) (Figura 24).

Figura 24: Níveis de expressão gênica do *CDC20* frente à presença de cariótipo Complexo.



Fonte: Próprio autor

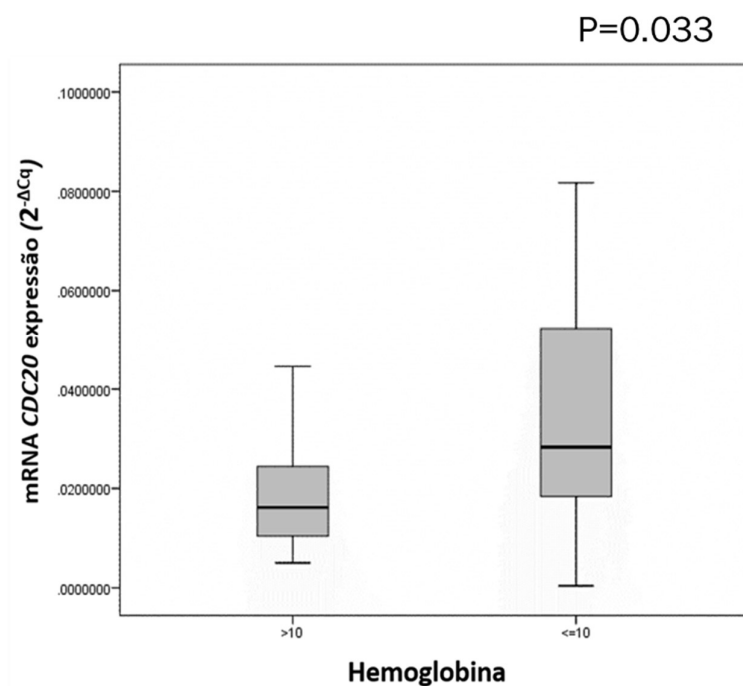
Nº Alterações	<i>CDC20</i> Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>CDC20</i> 2 ^{-ΔCq})				Anova	Teste de Levene	Games-Howell
	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior			
<i>Kt normal</i>	.012812658	.0088430148	.008100548	.017524768			0,002
<i>Kt Alterado não complexo</i>	.034587608	.0143950652	.024289999	.044885218	,000	,002	0,002
<i>Kt Alterado complexo</i>	.072720223	.0391099673	-.024434321	.169874768			0,204

‡ ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Games-Howell: Pós-teste de comparações múltiplas.

4.2.1.7 Expressão do gene *CDC20* em relação aos níveis de hemoglobina

Com relação aos valores de hemoglobina, o expressão do *CDC20* apresentou-se aumentado em pacientes com hemoglobina inferior a 10 g/dL, quando comparado a pacientes com hemoglobina superior a 10 g/dL ($p = 0,033$) (Figura 25).

Figura 25: Níveis de expressão gênica do *CDC20* em relação aos níveis de Hemoglobina



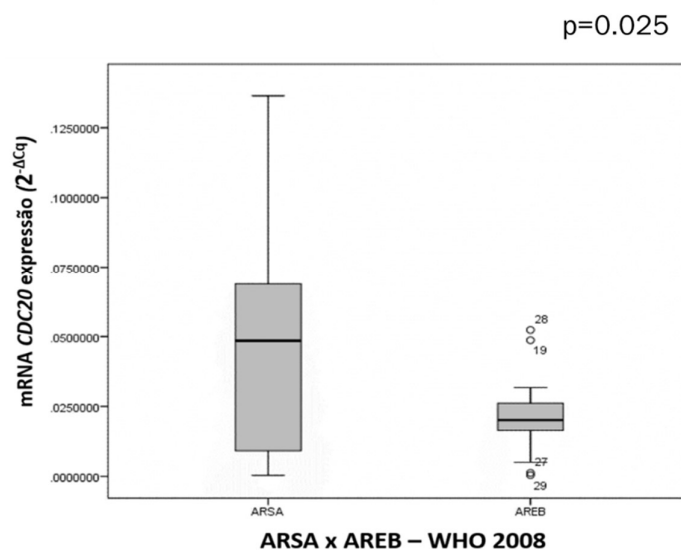
<i>CDC20</i> <i>Hemoglobina</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CDC20 2^{-ΔCq})</i>					
	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levne	p-valor
<i>Hb</i> ≤ 10g/dL	.000054720	.0000349322				
<i>Hb</i> > 10g/dL	.019139098	.0040691957	-.0257473696	-.001208067	.027	.033

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

4.2.1.8 Expressão do gene *CDC20* em relação à classificação ARSA x AREB WHO (2008)

Quanto à classificação do subgrupo, observou-se que houve aumento da expressão de *CDC20* naqueles pacientes subtipo ARSA em comparação com pacientes com AREB ($p=0,025$) (Figura 26).

Figura 26: Níveis de expressão gênica do *CDC20* frente aos subtipos ARSA e AREB



Fonte: Próprio autor

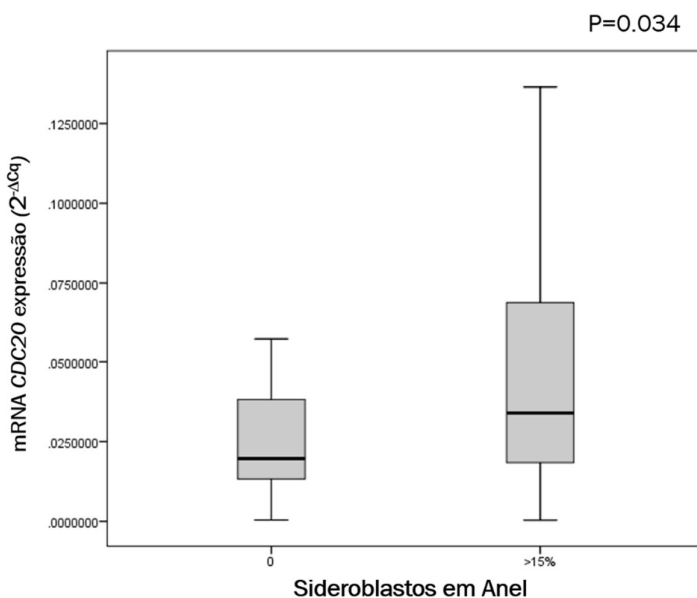
<i>CDC20</i> <i>WHO (2008)</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do <i>CDC20</i> $2^{-\Delta Cq}$)</i>					
	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
<i>ARSA</i>	.051324815	.0429761290				
<i>AREB</i>	.021594617	.0132976598	.0043768874	.0550835087	.000	.025

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

4.2.1.9 Expressão do gene *CDC20* em relação à presença de sideroblastos em anel.

Quanto à presença de sideroblastos em anel, observou-se que houve aumento da expressão de *CDC20* naqueles pacientes com presença de mais de 15% de sideroblastos em anel quando comparado aos pacientes com ausência dos mesmos ($p=0,034$) (Figura 27).

Figura 27: Níveis de expressão gênica do *CDC20* em relação a presença e ausência de sideroblastos em anel.



Fonte: Próprio autor

<i>CDC20</i> Sideroblastos em anel	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CDC20 $2^{-\Delta Cq}$)</i>					
	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
<i>Presença</i>	.049154101	.0401804273	.0020692946	.0468541426	.005	.034
<i>Ausência</i>	.024692383	.0182289513				

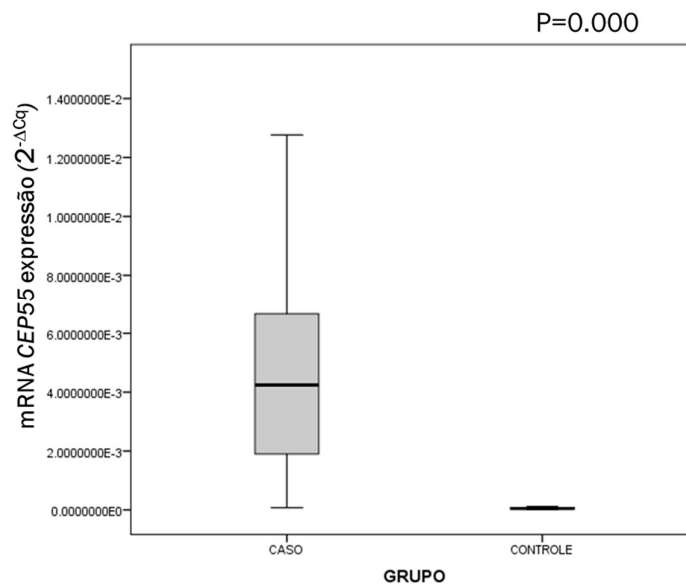
‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

4.2.2 Análise da expressão do gene *CEP55*

4.2.2.1 Expressão do gene *CEP55* em relação à variável grupo

Ao avaliar a relação *CEP55* em pacientes com SMD e controle, verificamos que houve aumento dos níveis de *CEP55* no grupo caso em relação ao grupo controle ($p = 0,000$) (Figura 28).

Figura 28: Níveis de expressão gênica do *CEP55* em relação a variável Grupo



Fonte: Próprio autor

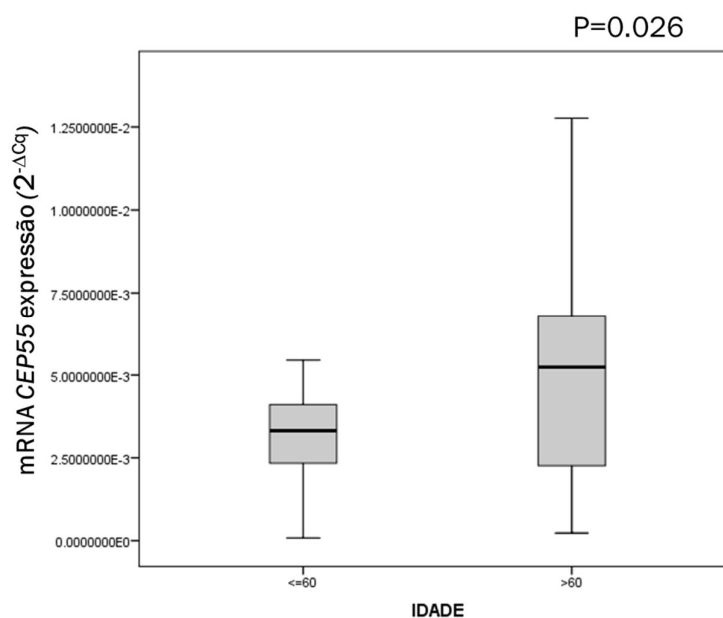
<i>CEP55</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CEP55 2^{-ΔCq})</i>						
	<i>Grupo</i>	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor
<i>Caso</i>		,004437677	,0029995703				
<i>Controle</i>		,000054720	,0000349322	,0034593504	,0053065631	,004	,000

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

4.2.2.2 Expressão do gene *CEP55* em relação à variável idade

Para a variável idade, estratificada em dois grupos: >60 anos e ≤60 anos, constatamos que pacientes com idade igual ou superior a 60 anos apresentavam aumento da expressão de *CEP55* ($p=0,026$) (Figura 29).

Figura 29: Níveis de expressão gênica do *CEP55* em relação à variável Idade



Fonte: Próprio autor

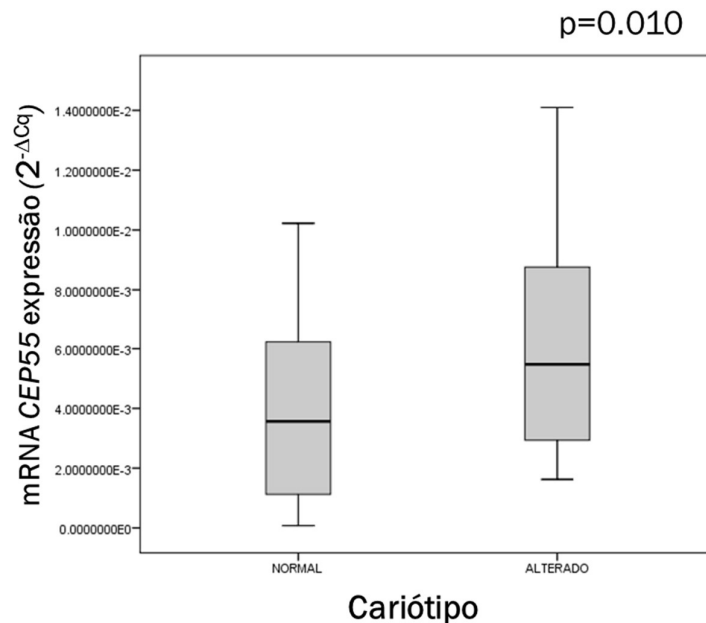
<i>CEP55</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CEP55 2^{-ΔCq})</i>						
	<i>Idade</i>	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor
	≤60 anos	.003337429	.0019803057				
	>60 anos	.005180943	.0033986391	-.0034609440	-.0002260829	,024	,026

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

4.2.2.3 Expressão do gene *CEP55* em relação à cariótipo normal e alterado

Quanto ao cariótipo, observou-se que níveis de *CEP55* estão aumentados nos pacientes com cariótipo alterado em comparação com os que apresentavam cariótipo normal ($p = 0,010$) (Figura 30).

Figura 30: Níveis de expressão gênica do *CEP55* frente à variável Cariótipo normal e alterado



Fonte: Próprio autor

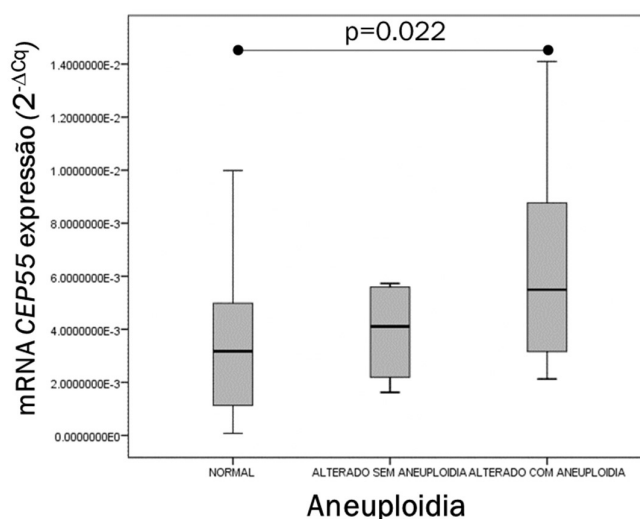
<i>CEP55</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CEP55 2^{-ΔCq})</i>						
	<i>Cariótipo</i>	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste de Levene	p-valor
<i>Normal</i>		.003761282	.0030768074	-.0054583162	-.0007999335	,290	,010
<i>Alterado</i>		.006890407	.0038924258				

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

4.2.2.4 Expressão do gene *CEP55* em relação ao cariótipo normal, cariótipo alterado com e sem aneuploidia

Quanto ao cariótipo, observou-se que níveis de *CEP55* estão aumentados nos pacientes com cariótipo alterado com aneuploidia em comparação com os que apresentavam cariótipo normal ($p = 0,022$) (Figura 31).

Figura 31: Níveis de expressão gênica do *CEP55* frente à cariótipo normal, cariótipo alterado com e sem aneuploidia



<i>CEP55</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CEP55 2^{-ΔCq})</i>				Teste		
	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova	de Levene	Tukey
<i>Normal</i>	.003453490	.0027841859	.002186144	.004721			.022
<i>Alterado sem Aneuploidia</i>	.003893825	.0020191971	.000680832	.007106818	.027	.169	-
<i>Alterado com Aneuploidia</i>	.006621954	.0040124426	.004197259	.009046649			.022

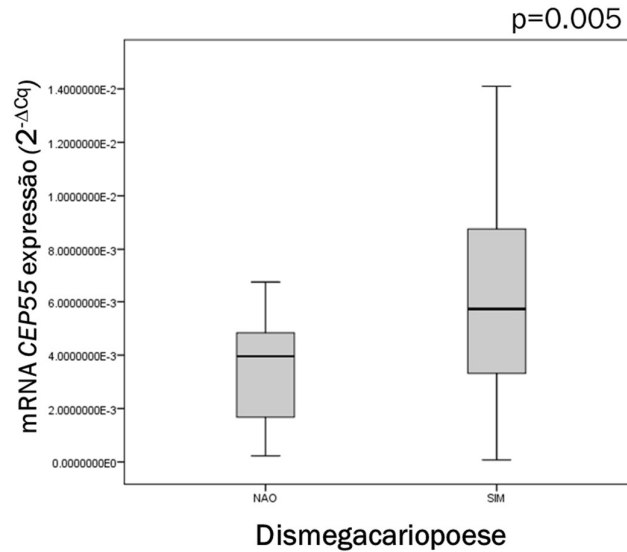
Fonte: Próprio autor

‡ ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas.

4.2.2.5 Expressão do gene *CEP55* em relação à dismegacariopoiese

Com relação ao setor megacariocítico, observamos que os níveis de *CEP55* apresentava-se aumentado nos pacientes com presença de dismegacariopoiese ($p=0,005$) (Figura 32).

Figura 32: Níveis de expressão gênica do *CEP55* frente a presença de Dismegacariopoiese



Fonte: Próprio autor

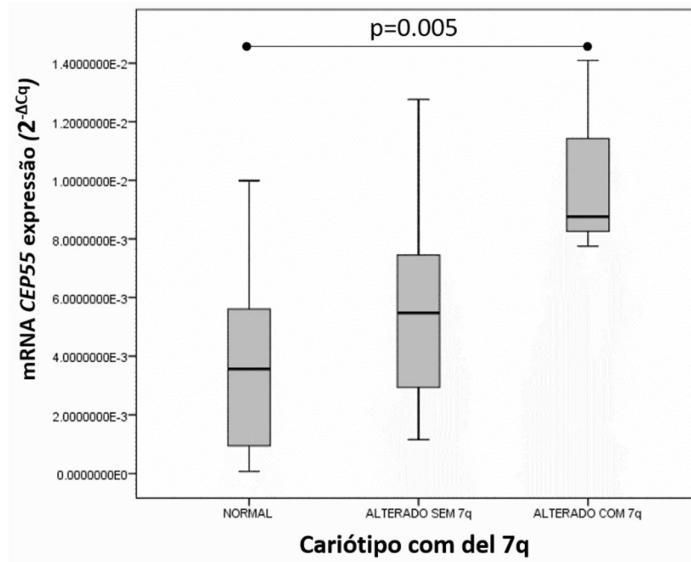
<i>CEP55</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CEP55 2^{-ΔCq})</i>						
	<i>Dismegacariopoiese</i>	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
<i>Não</i>		.003177341	.0020776580				
<i>Sim</i>		.006126564	.0036714812	-.0049677522	-.000930692	.056	.005

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

4.2.2.6 Expressão do gene *CEP55* em relação à presença de cariótipo com deleção 7q.

Quanto à presença de deleção 7q no cariótipo, observou-se que níveis de *CEP55* estão aumentados nos pacientes com cariótipo alterado com 7q em comparação com os que apresentavam cariótipo normal ($p = 0,005$) (Figura 33).

Figura 33: Níveis de expressão gênica do *CEP55* frente a variável cariótipo com e sem deleção 7q.



Fonte: Próprio autor

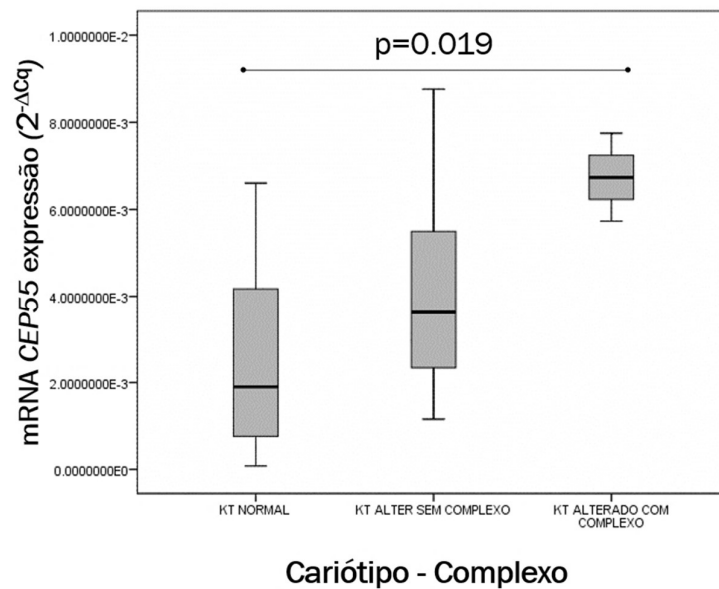
<i>CEP55</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CEP55 2^{-ΔCq})</i>						
	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova	Teste de Levene	Tukey
<i>Cariótipo del 7q</i>							
<i>Normal</i>	.003501915	.0006340694	.002174792	.004829038			.005
<i>Alterado sem del 7q</i>	.005832579	.0009776042	.003720593	.007944564			
<i>Alterado com del 7q</i>	.010202500	.0019677145	.001736108	.018668892	.004	.752	.005

‡ ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas.

4.2.2.7 Expressão do gene *CEP55* em relação à presença de cariótipo complexo

Quanto ao cariótipo, observou-se que níveis de *CEP55* estão aumentados em pacientes com cariótipo alterado complexo em comparação com os que apresentavam cariótipo normal ($p = 0,019$) (Figura 34).

Figura 34: Níveis de expressão gênica do *CEP55* frente a variável Cariótipo Complexo.



Fonte: Próprio autor

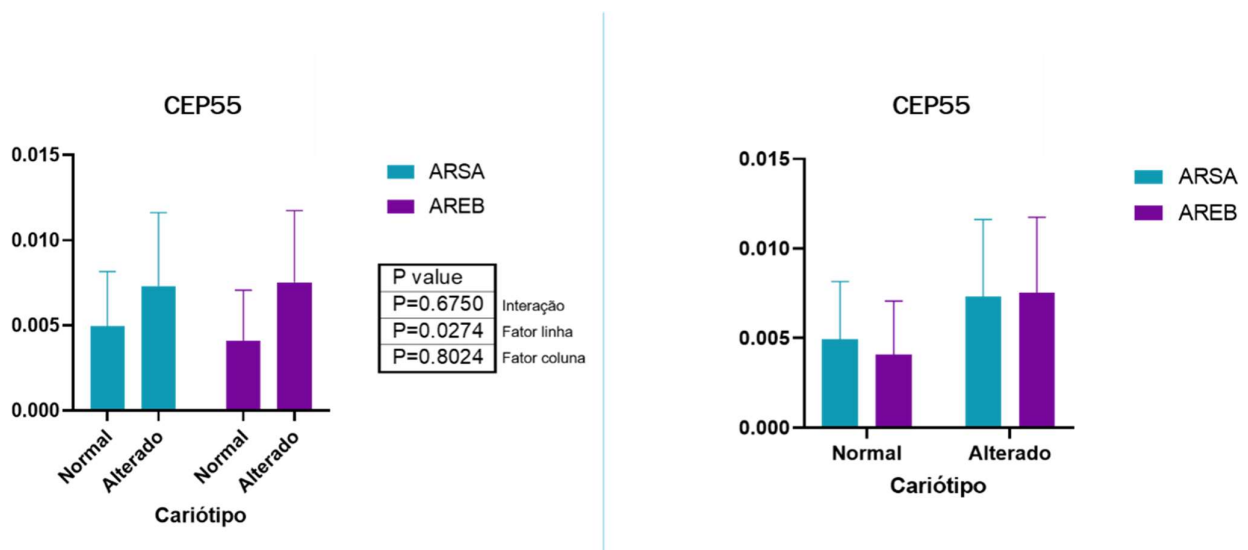
<i>CEP55</i>	<i>Nível de expressão (Expressão Gênica do CEP55 2^{-ΔCq})</i>						
	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Anova	Teste de Levene	Tukey
<i>Cariótipo Complexo Normal</i>	.002693500	.0005312795	.001567238	.003819762			.019
<i>Alterado sem complexo</i>	.004295800	.0007760705	.002540207	.006051393	.015	.137	
<i>Alterado com complexo</i>	.006738467	.004226608	.0005837930	.009250325			.019

‡ ANOVA one-way. Teste de Levene: Homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$. Tukey: Pós-teste de comparações múltiplas.

4.2.2.8 Expressão do gene *CEP55* em relação aos tipos SMD-SA (ARSA) e SMD-EB (AREB) e presença de cariótipo alterado

Para analisar o perfil da expressão de *CEP55* separadamente nos grupos SMD-SA e SMD-EB em relação à presença de cariótipo alterado foi realizado a análise de ANOVA *two-way* (Figura 35). O fato de não haver diferença significativa (Fator coluna, $p=0.80$) na expressão entre os grupos (ARSA e AREB) mostra que a expressão desse gene se comporta de maneira semelhante independente de qual grupo seja classificado. Quando em cada grupo se analisam os pacientes em relação às variáveis cariótipo normal e alterado foi possível observar que o *CEP55* segue o mesmo padrão em SMD-SA e SMD-EB (ou seja, não há diferença significativa $p=0.67$, interação) com expressão maior em cariótipo alterado quando comparado com o cariótipo normal. Assim, conforme relatado anteriormente (em teste t), há significância apenas quando considera-se a variável cariótipo alterado independente do grupo ao qual o caso pertença (Fator linha $p=0.027$).

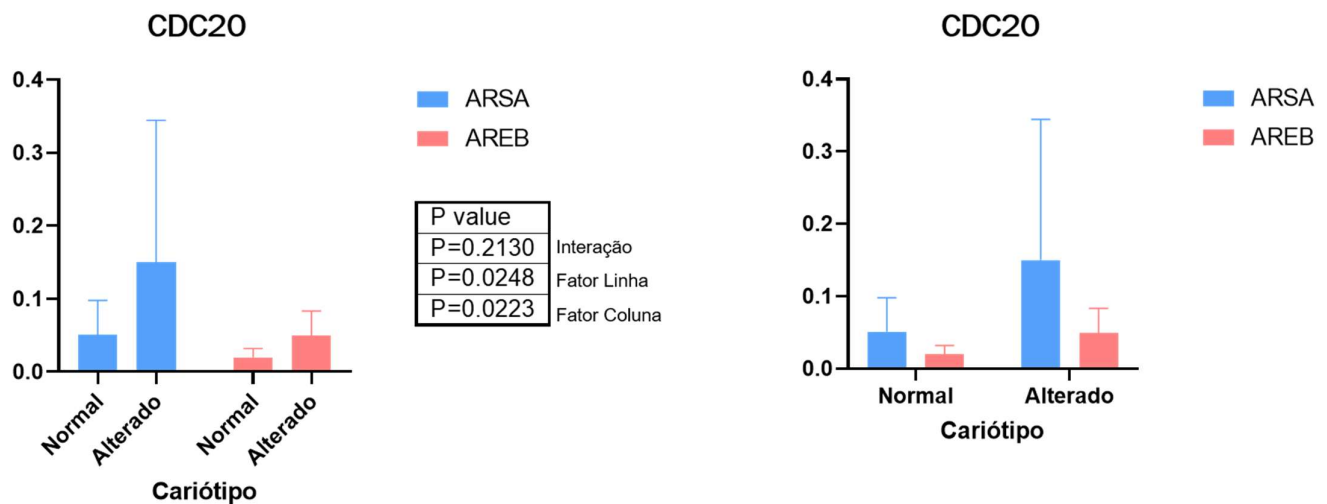
Figura 35: Níveis de expressão gênica do *CEP55* frente às variáveis cariótipo normal e alterado e classificação SMD-SA e SMD-EB.



4.2.2.9 Expressão gênica do *CDC20* em relação aos tipos SMD-SA (ARSA) e SMD-EB (AREB) e presença de cariótipo alterado

Para analisar o perfil de expressão de *CDC20* separadamente nos grupos SMD-SA e SMD-EB em relação à presença de cariótipo alterado foi realizado a análise de ANOVA *two-way* (Figura 36). Confirmando o que foi relatado anteriormente, em que o gene *CDC20* apresenta expressão diferencialmente aumentada em ARSA foi encontrado diferença significativa (Fator coluna, $p=0.02$) na expressão do gene *CDC20* entre os grupos (SMD-SA e SMD-EB). Quando em cada grupo se analisam os pacientes em relação à variável cariótipo (normal e alterado) não foi possível confirmar diferença entre os grupos SMD-SA e SMD-EB (ou seja, não há diferença significativa $p=0.21$, interação). Assim, conforme também referido anteriormente, há significância quando considera-se a variável cariótipo independente do grupo ao qual o caso pertença (Fator linha $p=0.022$).

Figura 36: Níveis de expressão gênica do *CDC20* relação aos tipos SMD-SA(ARSA) e SMD-EB (AREB) e presença de cariótipo alterado



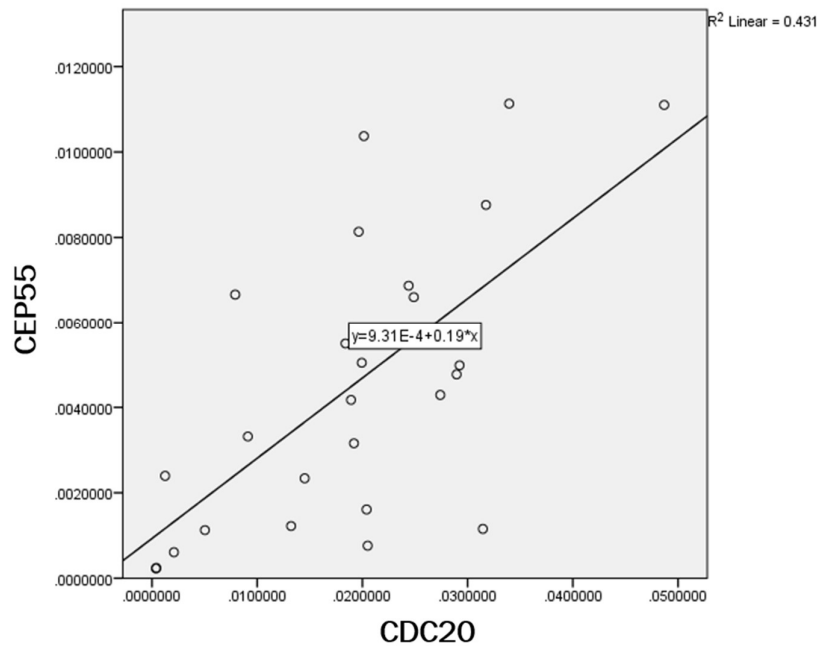
Não houve associações significantes com relação aos níveis de *CDC20* e *CEP55* e as variáveis sexo, presença de diseritropoiese e disgranulopoiese, porcentagens de blastos, classificação do valor de Hb, neutrófilos e plaquetas e do número de citopenias no sangue periférico, classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R, dependência transfusional, tratamento com eritropoietina, óbito e evolução para LMA ($p > 0,05$).

4.3 Análise de correlação entre os níveis de expressão dos genes CDC20 e CEP55

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi realizado para se analisar a intensidade da associação linear existente entre os genes e o r^2 (r square) analisar a influência de um gene sobre outro.

Foi observada moderada correlação positiva entre o gene CEP55 e CDC20 ($r = 0,656$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 43,1% ($r^2 = 0,431$) na variação dos níveis de expressão entre esses genes (Figura 37).

Figura 37: Gráfico da correlação de Pearson entre a expressão gênica dos genes *CDC20* e *CEP55*.



4.4 Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes CDC20 e CEP55 com outros genes anteriormente estudados

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi realizado para se analisar a intensidade da associação linear existente entre os genes *CDC20* e *CEP55* em relação a genes analisados anteriormente pelo nosso grupo. Os genes selecionados foram genes relacionados ao ciclo celular (*AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *TPX2*, *CDKN1A*), ao reparo do DNA (*ATM*, *RAD51*, *LIG 4*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XPA*, *XPC*, *XPG*, *CSA* e

CSB), às polimerases com atividade de translesão (*REV3L*, *REVI*, *POLI*, *POLH*, *POLL*, *POLK*, *POLQ*, *POLN* e *PCNA*).

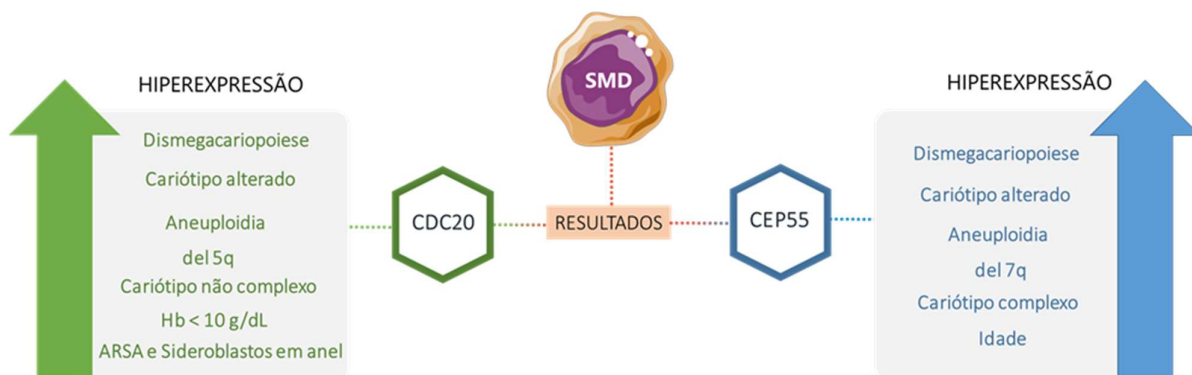
Após todas as análises foi observada significativa correlação moderada positiva entre o gene *CEP55* e genes da via de reparo de fita simples do DNA, *XPA*, *XPG* e *CSB* ($r = 0,674$; $r = 0,606$ e $r = 0,647$, respectivamente) e correlação moderada positiva entre o gene *CDC20* e outros genes do ciclo celular e verificação do fuso mitótico, *TPX2*, *AURB* e *MAD2* ($r = 0,560$; $r = 0,652$ e $r = 0,576$, respectivamente) (Tabela 7).

Tabela 7: Teste de correlação de Pearson entre os genes *CEP55* e *CDC20* e genes do ciclo celular e da via de reparo do DNA

	Gene	Pearson (r)	p (valor)
<i>CEP55</i>	ERCC6 (CSB)	0.647	0.031
	ERCC5 (XPG)	0.606	0.048
	XPA	0.674	0.023
<i>CDC20</i>	TPX2	0.560	0.037
	AURB	0.652	0.041
	MAD2	0.576	0.039

5. Representação esquemática dos resultados da análise de Expressão Gênica em pacientes com SMD

Figura 38: Resumo esquemático dos resultados encontrados.



6. DISCUSSÃO

O CDC20 orchestra o início da anáfase e a saída da mitose. O mau funcionamento do complexo CDC20-APC/C geralmente resulta em instabilidade cromossômica e predispõe as células normais a se tornarem malignas (CHI *et al.*, 2019). A hiperexpressão de *CDC20* mostrou ter forte conexão a diferentes tipos de cânceres (CHENG *et al.*, 2020; CHI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2015).

Genes codificadores de proteínas associadas ao centrôssomo representam potentes supressores de tumores ou oncogenes (KUMAR, 2013). O *CEP55* está entre a lista dos 10 genes hiperexpressos associados a resistência ao tratamento, instabilidade cromossômica e proliferação celular. O mesmo tem sido descrito como uma das 70 proteínas responsáveis pela instabilidade cromossômica dentre 12 diferentes tipos de neoplasias (KALIMUTHO *et al.*, 2018; SINHA *et al.*, 2019; SINHA; DUIJF; KHANNA, 2019).

A instabilidade genômica (ING) é uma característica bem definida do câncer, facilitando a aquisição de mutações somáticas evolutivas, levando à plasticidade e heterogeneidade do tumor. É um fenômeno que leva ao acúmulo de alterações genéticas devido à (1) segregação inadequada dos cromossomos, (2) falha no controle do ponto de verificação do ciclo celular e distúrbio mitótico, (3) defeitos na manutenção dos telômeros ou (4) falha no reparo do DNA danificado e duplicação do genoma (SINHA *et al.*, 2019).

O conceito de ING reflete, em muitos pontos, a própria patogênese da SMD (CHAMSEDDINE *et al.*, 2016). Assim, apesar da inquestionável essência heterogênea dessa doença, sua patogênese está estritamente ligada ao processo de ING, e mais especificamente, à instabilidade cromossômica (INC), que por sua vez possibilitou o estabelecimento de uma das variáveis prognósticas mais valiosa na SMD, a citogenética (ARBER *et al.*, 2016; BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011b; GREENBERG *et al.*, 2012b; RAZA; GALILI, 2012b; WINTER *et al.*, 2020).

O ciclo celular é um processo finamente orquestrado por uma rede complexa de proteínas interligadas, de modo que suas expressões devem ocorrer de forma harmônica em tempo e espaços precisos (CARMENA *et al.*, 2012; CHENG *et al.*, 2020; DE CÁRCER *et al.*, 2018). Neste contexto, este estudo mostrou a expressão gênica aumentada de *CDC20* e *CEP55* em pacientes com SMD comparados com indivíduos saudáveis, reafirmando o *CDC20* como um alvo de estudo promissor e abrindo uma nova

linha de investigação com o *CEP55*. A desregulação de ambos mostra-se particularmente associada a alterações cromossômicas e dismegacariopoiese.

Alterações numéricas e estruturais são conhecidas por serem uma característica comum da maioria das células tumorais. Estas podem contribuir para as etapas iniciais da tumorigênese e, ao mesmo tempo, são implicados à heterogeneidade do tumor (OLUKOGA; FERNÁNDEZ-CASAÑAS; CHAN, 2019).

Qualquer alteração no genoma se torna uma ameaça, uma vez que ultrapassa com sucesso a anáfase e a citocinese e é transmitida para a próxima geração de células, dando origem a uma linhagem celular com um novo conteúdo genômico potencialmente aberrante (BIZARD; HICKSON, 2018). Na SMD, o surgimento de células com alterações cromossômicas é quase sempre esperada e a análise do cariótipo no seguimento da doença, a fim de observar possível evolução clonal, deve ser sempre considerada, uma vez que a citogenética atua como forte fator prognóstico e, muitas vezes, determinante terapêutico (COSTA *et al.*, 2018; FRANÇA *et al.*, 2019).

Neste estudo, os genes *CDC20* e *CEP55* apresentaram-se hiperexpressos em pacientes com cariótipo alterado ($p=0.000$; $p=0.001$) comparado com aqueles com cariótipo normal. A ativação do *CDC20* é requisito essencial para o início da anáfase induzindo a segregação cromossômica (WANG *et al.*, 2015) enquanto o *CEP55*, a partir da citocinese, controla a separação das células-filhas, processo *CEP55*-dependente (JEFFERY *et al.*, 2016). Assim, sob desregulação, sugerimos que ambos parecem contribuir para o surgimento de anormalidades citogenéticas, uma característica marcante em SMD.

O SAC é um mecanismo de vigilância que representa a principal proteção contra erros de segregação cromossômica (HOLLAND; CLEVELAND, 2009). Assim, o SAC controla a progressão da mitose e sua ativação determina a parada mitótica (GHELLI; MARTINELLI; SIMONETTI, 2019).

O sucesso do SAC depende da inativação do *CDC20* no complexo APC/*C^{CDC20}* pelo Complexo de Checkpoint Mitótico (MCC). Neste cenário, a hiperativação do *CDC20* pode representar um mecanismo de “escape” deste sistema de vigilância, exibindo, assim, uma função oncogênica (SCHROCK *et al.*, 2020). Desta forma, o aumento da disponibilidade de *CDC20* e de sua forma livre (não ligada a *MAD2* e ao MCC) pode induzir a ativação forçada do APC/*C* com consequente entrada prematura da célula na anáfase levando a um ciclo celular desregulado (com *Mitotic Slippage*) (VANGENDEREN; HARKNESS; ARNASON, 2020).

O enfraquecimento do MCC também pode gerar instabilidade genômica, uma vez que sua função onco-supressora estará prejudicada (GHELLI; MARTINELLI; SIMONETTI, 2019; HOLLAND; CLEVELAND, 2009). Em estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, analisamos mais de 100 pacientes com SMD e mostramos que um dos principais inibidores do CDC20, o *MAD2*, apresentou expressão gênica diminuída nestes pacientes. Assim, o MCC subfuncional via *MAD2* associado à hiperatividade do CDC20 pode ter um papel importante na patogênese da SMD.

Na LMA e LLA há superexpressão constitutiva ou temporária do *MAD2*. Essa hiperexpressão hiperativa o SAC, prolonga a parada mitótica, atrasa a mitose e gera instabilidade genética e aneuploidia (GHELLI; MARTINELLI; SIMONETTI, 2019). A expressão aumentada de *MAD2* também induz poliploidia (DAVOLI, 2011), que por sua vez pode gerar aneuploidia, a partir de divisões multipolares (STORCHOVA; PELLMAN, 2004). Em estudo do nosso grupo, foi observado a nível protéico a hiperexpressão de *MAD2* associada a trombocitopenia grave e prognóstico desfavorável (GENGA *et al.*, 2015).

Linhagens e amostras de culturas primárias de LMA exibem expressão reduzida de *BUBR1*, outro componente do MCC, em comparação com precursores normais da medula óssea (CD34+). Isso induz a atenuação do MCC, uma vez que o *BUBR1* se liga diretamente ao CDC20 e também é um inibidor da APC/C^{CDC20}. Assim, as células com expressão reduzida de *BUBR1* são capazes de progredir através da mitose, mesmo na presença de aberrações estruturais do DNA, graças à ativação da APC/C^{CDC20} (GHELLI ;MARTINELLI; SIMONETTI, 2019).

Paralelamente ao SAC, as quinases *AURKA*, *AURKB* e *PLK1* são hiperexpressas em LMA e induzem falhas no ponto de verificação mitótico, má segregação cromossômica e controle desregulado do ciclo celular, respectivamente (GHELLI; MARTINELLI; SIMONETTI, 2019). Lucena-Araújo *et al.* (2011) mostrou presença de alterações citogenéticas desfavoráveis associadas a hiperexpressão de *AURKA* e *AURKB* em amostras de LMA a partir de RT-qPCR e análise da FISH. Em pacientes com SMD, Genga *et al.* (2015) associou a hiperexpressão de *AURKB* à cariótipo alterado a partir de imunohistoquímica. Enquanto que Heredia *et al.* (2015) observou nesses pacientes a amplificação de *AURKA* em FISH, esse achado foi confirmado por De Oliveira *et al.* (2013) em células hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais de pacientes com SMD associando à presença de alterações cromossômicas (principalmente aneuploidia) pela mesma técnica.

Assim, um ponto de verificação mitótico ineficiente ou hiperativo, refletido na expressão desregulada de vários genes do ciclo mitótico, é uma das principais causas do surgimento de INC em câncer (SINHA; DUIJF; KHANNA, 2019).

Células “presas” em uma mitose de tempo prolongado apresentam possíveis destinos característicos: (1) completar a divisão celular, devido à anáfase e à citocinese prematura com segregação errônea dos cromossomos, levando à aneuploidia; (2) morte celular ou (3) adaptação do ponto de verificação (*Mitotic slippage*), no qual há um desvio mitótico em que as células contornam a mitose e retornam à interfase sem divisão celular (como células tetraplóides) (GHELLI; MARTINELLI; SIMONETTI, 2019).

Após o *Mitotic slippage* (MS), as células tetraplóides podem ter vários destinos, um deles ocorre quando o ponto de verificação da tetraploidia é comprometido (por exemplo, nas células com defeito na p53). As células tetraplóides passam por nova divisão celular, resultando em aneuploidia e morte celular, porém clones aneuplóides viáveis podem surgir (STORCHOVA; PELLMAN, 2004). Assim, a “derrapagem mitótica” é um dos pré-requisito para a sobrevivência das células aneuplóides e representa uma fonte de aneuploidia que surge a partir de uma célula que contém múltiplos centrossomos que entra na mitose (SINHA; DUIJF; KHANNA, 2019).

No presente estudo, houve um achado importante também relacionado ao cariótipo: a presença de aneuploidia. A expressão de *CDC20* e *CEP55* está aumentada em pacientes com cariótipo aneuplóide ($p=0.013$; $p=0.022$) quando comparado com cariótipo normal. Assim, sugerimos que a hiperexpressão de *CDC20* parece induzir um escape no ponto de checagem mitótica, contornando a parada mitótica e dando continuidade à mitose aberrante. Adicionalmente, *CEP55* desempenha um papel central na determinação do destino celular de células aneuplóides durante distúrbios na mitose induzindo *Mitotic Slippage* (SINHA; DUIJF; KHANNA, 2019).

O APC^{CDC20} exerce uma função carcinogênica durante a passagem da metáfase em anáfase. Níveis anormais ou disfunção do CDC20 podem inibir a parada mitótica, promovendo a saída prematura da mitose, a partir do relaxamento do controle da ativação APC/C, levando à aneuploidia das células filhas (ZHANG *et al.*, 2019). Enquanto a hiperexpressão de *CEP55* protege populações heterogêneas de células aneuplóides e seu *knockout* induz a ativação prematura de CDK1, levando, portanto, à morte celular, facilitando o limiar da apoptose e prevenindo o *Mitotic slippage* (SINHA; DUIJF & KHANNA, 2019).

O CDC20 promove a ubiquitinação e consequente degradação da P21. A superexpressão do CDC20 reduz acentuadamente os níveis de P21, proteína que desempenha um papel central na supressão das células iniciadoras de tumor (SCHROCK *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2019). A Aurora A e B induzem a ativação do p53 após *Mitotic Slippage* e impedem que as células entrem no ciclo celular através da regulação positiva do inibidor de CDK, P21, induzindo a parada do ciclo celular e apoptose (GHELLI; MARTINELLI; SIMONETTI, 2019).

A hiperexpressão de CDC20 pode ter um papel na inibição da P21, atenuando o ponto de verificação do ciclo celular da via p53/p21 na fase G1, conhecido como ponto de verificação de tetraploidia e podendo desempenhar um papel central no estabelecimento do *Mitotic slippage* (STORCHOVA; PELLMAN, 2004). Em estudo de Zhao *et al.*, (2013), pacientes com SMD com cariótipo anormal apresentaram menores níveis de mRNA de P21 do que aqueles com cariótipo normal.

Simonetti *et al.*, 2019 realizou uma análise computacional combinada com significado biológico e encontrou uma assinatura de três genes composta por *PLK1* e *CDC20* superexpressos e *RAD50* com regulação negativa, que discriminaram 73% dos pacientes com LMA aneuplóide e LMA euplóide. A regulação negativa de *RAD50* e a regulação positiva de *PLK1* e *CDC20* foram confirmadas a nível de proteína, e isso indica que um processo de várias etapas envolvendo diferentes fases do ciclo celular e a via de reparo do DNA prejudicada pode culminar na LMA aneuplóide. Adicionalmente a isso, há um silenciamento estrutural ou funcional da transcrição de p53, chamado pelos autores de guardião da ploidia, os mesmos também sugerem que sua expressão pode estar prejudicada pela a regulação positiva do *PLK1*.

Como já mencionado, a expressão de CEP55 é reprimida via p53 como resultado da regulação negativa dos níveis de proteína PLK1, p53 liga-se diretamente ao promotor *PLK1* e inibe a transcrição do mesmo. O PLK1, por sua vez, controla a ativação e recrutamento espaço-temporal do CEP55 sendo absolutamente necessário para a função do CEP55 e para o êxito da abscisão. Segundo Schrock *et al.* (2020), a PLK1 também fosforila e inibem APC/C independentemente do MCC, e pode ser uma via importante para o prologamento “extra” na parada mitótica.

Surpreendentemente, o p53 induzido por dano ao DNA também regula negativamente a transcrição do *CDC20* através da ligação direta ao seu promotor. Isso leva à remodelação da cromatina, reprimindo, assim, o *CDC20* (BANERJEE; NATH; ROYCHOUDHURY, 2009; WANG *et al.*, 2015).

Neste estudo, os genes *CDC20* e *CEP55* estão ambos hiperexpressos em pacientes com dismegacariopoiese ($p=0.033$; $p=0.005$) quando comparado com aqueles que não apresentaram displasia nessa linhagem.

Em estudo realizado por Yagi & Roth (2006) observou-se que a expressão de *PLK1* e *p55CDC/CDC20* (um homólogo de *CDC20* humano) é diminuída no Megacariócito (MC) poliplóide. A expressão de *PLK1* diminui drasticamente na poliploidização de MC e a sua expressão aumentada está associada a uma diminuição nos níveis de poliploidia. Estes resultados também sugeriram que a expressão de *PLK1* e *p55CDC* em MC 2N/4N é semelhante à de outros tipos de células em divisão ativa e a expressão do *MAD2* é semelhante no MC e em outras células hematopoiéticas em divisão.

Segundo os mesmos autores, níveis reduzidos de mRNA para *Aurora B* foram relatados na poliploidização de linhagens de células MC ou MC primárias. *Aurora B* recruta alvos inibidores da APC (incluindo *MAD2*) aos cinetócoros, e a inibição de sua função resulta em poliploidia. Porém, apesar da semelhança no fenótipo entre células sem função de *Aurora B* e poliploidização de MC, a ausência de *Aurora B* parece não estar subjacente à endomitose. A insuficiência da função *Aurora B* leva a segregação cromossômica desigual (YAGI; ROTH, 2006), característica já reconhecida nos megacariócitos (RAVID *et al.*, 2002).

Em outro estudo, Trakala *et al.* (2015) reafirmaram que a ausência de *Aurora A* ou *Aurora B* não prejudica a poliploidização em megacariócitos em cultura, portanto, são dispensáveis para a maturação de megacariócitos. Quanto ao processo de poliploidização em megacariócitos em modelos murinos, esses autores observaram que o *knockout* genético do *CDC20* resulta em parada mitótica e trombocitopenia grave, indicando que a endomitose é o principal mecanismo de poliploidização de megacariócitos *in vivo*. Enquanto o *knockout* de *CDK1*, evita a endomitose, mas não prejudica a formação de plaquetas. Isso ocorre como consequência da reprogramação da endomitose para endociclos que alternam a síntese de DNA e as fases G, mostrando que megacariócitos podem usar diferentes tipos de ciclos celulares não convencionais para se tornar poliplóides sem perder a funcionalidade celular *in vivo* mesmo com a perda de eficiência comparado com as endomitoses.

Assim, em megacariócitos sob ausência do *CDC20*, as células ficam presas na mitose com APC/*C^{CDC20}* não funcional. Apenas essa condição resultou em um fenótipo dramático caracterizado pela falta de células maduras e um aumento significativo de progenitores e pequenos megacariócitos na medula óssea. Além disso, as populações 16N

e 32N estavam quase ausentes, enquanto os megacariócitos 4-8N eram mais abundantes e mais de 80% dos megacariócitos maduros param na mitose na ausência de CDC20. (TRAKALA *et al.*, 2015). Nesse contexto, tanto a hiperexpressão como a ausência completa do CDC20 demonstram-se ser prejudiciais ao processo de desenvolvimento da linhagem megacariocítica, talvez muito pelo fato dessas células terem uma variante do ciclo celular que tem forte relação com os genes mitóticos.

Na maioria dos casos, a poliploidia programada para o desenvolvimento é um processo irreversível, ligado à diferenciação celular terminal e à aquisição de novas capacidades funcionais. Ao passo que também pode ser uma rota rápida para a aneuploidia e instabilidade do genoma (TRAKALA *et al.*, 2015). Fusos mitóticos multipolares estão presentes em megacariócitos e hepatócitos poliplóides, associados a presença de vários centrossomos. Os eixos multipolares afetam a fidelidade da segregação e faz com que os cromossomos se distribuam de maneira desigual durante a mitose nessas células (RAVID *et al.*, 2002; TORMOS; TALÉNS-VISCONTI; SASTRE, 2015).

Um estudo interessante de Roy *et al.* (2001), a partir de megacariócitos em cultura de células CD34+ em MO de indivíduos saudáveis, mostrou que essas células tem uma segregação assimétrica de cromossomos na anáfase. Assim foi investigado se o controle do ponto de verificação era normal em megacariócitos. Os resultados mostraram que megacariócitos têm *checkpoints* normais na metáfase/anáfase, com expressão normal de p53/CDC/hCDC20 e Hcdh1 (homólogos dos CDC20 e CDH1 humanos), e o alvo principal deles, a Ciclina B1, era normalmente degradada. Em relação à segregação dos cromossomos, após analisar por microscopia confocal a segregação dos cromossomos 1 e 7 (escolhidos devido sondas disponíveis no mercado), observou-se a presença de segregação assimétrica desses cromossomos.

A diferença entre a endomitose encontrada nos megacariócitos e a derrapagem mitótica é apenas semântica, ambas geram poliploidia, a última, porém, é originada a partir de processos patológicos (STORCHOVA; PELLMAN, 2004). Nesse contexto, seria possível, então, que a linhagem megacariocítica displásica associada à desregulação dos genes *CDC20* e *CEP55* atue, de alguma forma, na origem das alterações cromossômicas em SMD? Ou esse processo normal em megacariócitos é apenas um espelho intrigante do que ocorre em outras células sob a disfunção desses genes (ou outros como *AUKB*), levando ao surgimento de alterações cromossômicas a partir de poliploidia induzida por *Mitotic Slippage*?

Independentemente da resposta, a partir dos resultados obtidos nesse estudo, a desregulação do gene *CEP55* parece ter um papel central no ciclo celular “atípico” dos megacariócitos. Do mesmo modo ocorre com o *CDC20*, corroborado com estudos anteriores do nosso grupo que utilizaram uma *coorte* diferente de pacientes. Ambos, mostram, assim, uma relação de destaque na disfunção dessa linhagem em SMD.

As anormalidades cromossômicas mais comuns na SMD são del (5q) /monosomia 5, del (7q)/monosomia 7 e trissomia 8. A detecção de anormalidades cromossômicas pela banda G é um dos parâmetros prognósticos mais fortes em SMD, como refletido nos 5 grupos prognósticos citogenéticos do sistema IPSS-R (FRANÇA *et al.*, 2019).

Em relação à expressão do *CEP55*, encontramos níveis aumentados em pacientes com cariótipo com del(7q) e cariótipo complexo quando comparado com aqueles com cariótipo normal ($p=0.000$; $p=0.000$).

A deleção (7q) compõe o IPSS-R e é classificada no subgrupo prognóstico intermediário quando única, ou prognóstico desfavorável quando acompanhada de outra alteração, nessa categoria encontra-se uma das alterações mais relevantes nessa doença, a monossomia 7. Adicionalmente, o cariótipo complexo apresentam em subgrupo muito desfavorável é o achado mais devastador na doença (GREENBERG *et al.*, 2012b). Assim, esses resultados mostram a hiperexpressão dos dois genes associados à alterações cromossômicas importantes em SMD.

Em estudo com modelos murinos, Sinha *et al.* (2019) mostrou que a hiperexpressão de *CEP55* causa alterações numéricas e estruturais como consequência da alta frequência de pontes de cromatina na anáfase e formação de micronúcleos durante a segregação cromossômica, além da saída mitótica tardia devido à microtúbulos estabilizados. Isso pode explicar os nossos achados de aumento da expressão desse gene em pacientes com alterações estruturais importantes como del(7q) assim como aneuploidia e a presença de cariótipo complexo (CC).

A presença de CC está fortemente correlacionada com a mutação do gene *TP53* (BEJAR *et al.*, 2011b). A maioria dos pacientes com esta mutação (cerca de 90%) exibem CC (OGAWA, 2019), especialmente aqueles com lesão bialélica de *TP53* (OGAWA, 2019; BOETTCHER, S; EBERT, B. L., 2020). Particularmente quando se trata de -5/del(5q) e del(17p) geralmente *TP53* mutado indica mal prognóstico. Em casos com del(5q) isolada, por exemplo, a qual geralmente é associada a um quadro hematológico único e favorável (síndrome 5q), tem sido comumente vista em parte de CCs entre os casos com *TP53* mutado (BEJAR *et al.*, 2011b; HASSERJIAN, 2019; OGAWA, 2019).

Dentre os eventos que levam à ativação da p53 sob mitose prolongada podemos citar três modelos hipotéticos: (1) de acordo com o modelo do "relógio mitótico", as células devem monitorar a duração da mitose e acumular p53 lentamente durante a mitose; (2) no modelo "ploidia de DNA ou contador de centrosomo", a ativação da p53 deve ocorrer nas células tetraplóides após derrapagem mitótica ou inibição da citocinese e (3) o dano ao DNA medeia a indução de p53 pós *Mitotic slippage* (GHELLI; MARTINELLI; SIMONETTI, 2019).

Como mencionado anteriormente, em estudo colaborativo com mais de 20 centros de pesquisa em uma grande *coorte* de 3.324 casos de SMD, destas, 132 amostras foram provenientes do Brasil a partir de dois centros. Nosso grupo de pesquisa contribuiu com 83 amostras ajudando a mostrar que o estado alélico (mono ou bialélico) do *TP53* delinea dois grupos biologicamente e clinicamente diferentes e relevantes da doença. Foi demonstrado que a mutação bialélica do *TP53* em SMD está fortemente associada à instabilidade genômica, resistência ao tratamento, progressão para LMA e mau prognóstico, quando comparado com a mutação monoalélica. A mutação bialélica foi identificada como um preditor independente do IPSS-R para o risco de morte e transformação para LMA. Surpreendentemente, os pacientes com *TP53* monoalélico não diferiram dos pacientes com o tipo selvagem no que diz respeito à resposta à terapia, sobrevida global e progressão leucêmica (BERNARD et al., 2020).

Em 2011, Bejar *et al.* relatou que pacientes com *TP53* mutante e um CC apresentam uma escassez de mutações em outros genes, sugerindo que esse grupo poderia ser considerado como tendo uma subclasse molecular distinta de outras formas da doença com um mecanismo patogênico exclusivo.

Nesse contexto, Bernard et al. (2020) mostrou que o padrão de co-mutações e a presença de cariótipo também é diferente entre os estados alélicos desse gene. Apenas 13% dos pacientes com *TP53* monoalélico tinham cariótipo complexo e enquanto 91% dos pacientes com *TP53* bialélico tinham essa alteração. Em relação à presença de outras mutações, 40% dos pacientes bialélicos não tinham nenhuma mutação *driver* identificável diferente de *TP53*, enquanto 90% dos pacientes monoalélicos tinham pelo menos uma mutação *driver* e 50% tinham pelo menos três. Estes achados implicam que a precisão diagnóstica/prognóstica e a vigilância da SMD requer a avaliação do estado alélico do gene *TP53*.

A inativação de *TP53* parece ter um papel crucial na aquisição de CC, onde a mutação em *TP53* pode permitir que células aneuplóides anormais sobrevivam sem sofrer

apoptose mediada pela p53 ou parada do ciclo celular no ponto de verificação G2 (OGAWA, 2019). Assim, o *TP53* é um peça chave no controle do destino de células cancerígenas que emergem de distúrbios mitóticos. Diante dessa relação íntima do *TP53* com o ciclo celular e os dados de genes de checkpoint mitótico anteriormente estudados, adicionados aos resultados atuais fortemente relacionados a variável cariótipo, sugerimos que essa classe molecular única, mencionada por Bejar et al. (2011), esteja associada aos genes do ciclo celular, como *CDC20* e *CEP55*. Ambos são regulados direta ou indiretamente pelo p53 (BANERJEE; NATH; ROYCHOUDHURY, 2009; CHANG *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016; SINHA *et al.*, 2019;; WANG *et al.*, 2015)

Diante do exposto, é importante destacar que mostramos a expressão significativamente aumentada do gene *CEP55* em pacientes com CC. Enquanto que, em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, Genga *et al.* (2015) relatou o aumento da expressão de *CDC20* (a nível protéico) em cariótipo complexo a partir da análise imunohistoquímica de pacientes com SMD. Estudos futuros podem, assim, avaliar uma possível relação da presença de *TP53* mutado e não funcional com uma consequente disfunção dos genes *CDC20* e *CEP55* levando a um desfecho desfavorável em SMD, além da investigação de possíveis vias de atuação dos mesmos.

Os genes de pontos de verificação da montagem do fuso são raramente mutados, mas são frequentemente desregulados em nível de RNAm e protéico em vários tumores (GHELLI; MARTINELLI; SIMONETTI, 2019; SIMONETTI *et al.*, 2019). A expressão aumentada ou diminuída desses genes mostrou ter potencial oncogênico em camundongos (SIMONETTI *et al.*, 2019). Isso sugere possíveis alterações na regulação epigenética, transcricional e pós-transcricional. Mutações de vias oncogênicas ou supressoras de tumor, por exemplo, podem levar à expressão desregulada dos genes SAC (SIMONETTI; BRUNO; *et al.*, 2019).

De fato, em SMD, particularmente, poucos são os genes do ciclo celular relatados em painéis mutacionais em revisões recentes (BEJAR *et al.*, 2011; NAKAJIMA, 2020; OGAWA, 2019; RAZA; GALILI, 2012). Isso reafirma, a importância dos nossos estudos que mostram a ampla desregulação na expressão desses genes em SMD, especialmente, correlacionados com variáveis críticas na patogênese da doença (BORGES *et al.*, 2018; GENGA *et al.*, 2015; HEREDIA, F. F. *et al.*, 2014).

Para analisar o perfil da expressão de *CDC20* separadamente nos grupos SMD-SA (ARSA) e SMD-EB (AREB) em relação à presença de cariótipo alterado foi realizado a análise de ANOVA *two-way*. Em relação à variável cariótipo (normal e alterado) não

foi possível confirmar diferença de expressão entre os grupos ARSA e AREB (ou seja, não há diferença significativa $p=0.21$, interação). Assim, há significância apenas quando considera-se à variável cariótipo independente do grupo ao qual o caso pertença (Fator linha $p=0.022$). Apesar disso, é possível observar que a expressão de CDC20 dentro do grupo ARSA apresenta-se destacadamente aumentada no pacientes com cariótipo alterado quando comparado com os com cariótipo normal (Figura 36).

Apesar desses resultados, ao realizar a análise dos casos ARSA, dentre 15 casos, 5 (33%) apresentaram cariótipo alterado (dois com deleção 5q e três com aneuploidia), 8 cariótipos eram normais e 2 ausências de metáfases. Enquanto que, entre os 23 casos AREB, 7 (30%) tinham cariótipos alterados (quatro apresentavam del 5q e seis eram aneuplóides), 12 cariótipos normais e 4 ausência de metáfases. Isso mostra a presença porcentagem maior de alterações cromossômicas no grupo ARSA o que não é esperado entre um grupo de baixo risco, talvez mostrando a força de associação da variável cariótipo alterado em relação à hiperexpressão do gene CDC20 dentro desse grupo.

Após realizar correlação de Pearson foi possível observar correlação moderada positiva ($r=0.646$) entre o gene *CEP55* e *CDC20*, demonstrando uma influência de 43,1% ($r^2 = 0,431$) nos níveis de expressão de um gene sobre o outro, sugerindo que os mesmos podem desempenhar um papel sinérgico nos achados em comum encontrados. Também foi observado correlação moderada positiva entre o CEP55 e genes da via de reparo de fita simples do DNA, XPA, XPG e CSB ($r = 0,674$; $r = 0,606$ e $r = 0,647$, respectivamente) e correlação moderada positiva entre o gene *CDC20* e outros genes do ciclo celular e verificação do fuso mitótico, *TPX2*, *AURB* e *MAD2* ($r = 0,560$; $r = 0,652$ e $r = 0,576$, respectivamente).

Esses achados podem ser explicados pela grande interação e interdependência dos genes mitóticos durante as fases do ciclo celular. Quanto a correlação entre *CEP55* e os genes de reparo de DNA, Sinha *et al.* (2019) relatou que o CEP55 promove um ciclo celular mais rápido com o aumento da velocidade da forquilha de replicação e induz danos ao DNA. A hiperativação da via AKT induzida por CEP55 resulta em sequestro citoplasmático de CHK1 e isso pode resultar em ponto de verificação da fase S/G2 comprometido.

Finalmente, os dados expostos sugerem os genes *CDC20* e *CEP55* como possíveis novos alvos para o estudo da patogênese de SMD, que evidentemente necessitam de mais estudos, validações e investigações aprofundadas urgentes em cultura de linhagens e/ou modelos murinos.

7. CONCLUSÃO

O aumento dos níveis de expressão dos genes *CDC20* e *CEP55* pode estar associado a patogênese da SMD. A desregulação de ambos mostrou-se particularmente associada a alterações cromossômicas e dismegacariopoiese. A hiperexpressão do *CDC20* e *CEP55* pode desempenhar um papel no estabelecimento da dismegacariopoiese em pacientes com SMD. Assim, estes genes podem ser alvos potenciais em novas pesquisas com foco em instabilidade cromossômica e maturação da linhagem megacariocítica, assim como a investigação do seu papel na patogênese da doença.

8. REFERÊNCIAS

ADÈS, L; ITZYKSON, R; FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2239–2252, jun. 2014.

AGUIAR, A. P. N. *et al.* Myelodysplastic syndromes: An analysis of non-hematological prognostic factors and its relationship to age. **Journal of Geriatric Oncology**, , p. S1879406819301146, jul. 2019.

ALESHIN, A; GREENBERG, P L. Molecular pathophysiology of the myelodysplastic syndromes: insights for targeted therapy. **Blood Advances**, v. 2, n. 20, p. 2787–2797, 23 out. 2018.

ARBER, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 19 maio 2016.

BALL, B. J. *et al.* Venetoclax and hypomethylating agents (HMAs) induce high response rates in MDS, including patients after HMA therapy failure. **Blood Advances**, v. 4, n. 13, p. 2866–2870, 14 jul. 2020.

BARREYRO, L; CHLON, T M.; STARCZYNOWSKI, D T. Chronic immune response dysregulation in MDS pathogenesis. **Blood**, v. 132, n. 15, p. 1553–1560, 11 out. 2018.

BEJAR, R; LEVINE, R; EBERT, B. L. Unraveling the Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 5, p. 504–515, 10 fev. 2011.

BEJAR, R; STEENSMA, D P. Recent developments in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 124, n. 18, p. 2793–2803, 30 out. 2014.

BEJAR, R. *et al.* Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2496–2506, 30 jun. 2011a.

BELLI, C. B. *et al.* Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients: Myelodysplastic syndromes in South America. **American Journal of Hematology**, v. 90, n. 10, p. 851–858, out. 2015.

BERNARD, E. *et al.* Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. **Nature Medicine**, 3 ago. 2020.

BHUTTA, M; MCINERNY, C; GOULD, G. ESCRT Function in Cytokinesis: Location, Dynamics and Regulation by Mitotic Kinases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 21723–21739, 25 nov. 2014.

BIZARD, A H; HICKSON, I. Anaphase: a fortune-teller of genomic instability. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 52, p. 112–119, jun. 2018.

BOETTCHER, S; EBERT, B. L. TP53-Mutant Myeloid Malignancies, HemaSphere: June 2020 - Volume 4 - Issue S2 – p. 165. 2020.

BORGES, D. P. *et al.* Prognostic importance of Aurora Kinases and mitotic spindle genes transcript levels in Myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 64, p. 61–70, jan. 2018.

BOWER, J.J. *et al.* Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells. **npj Breast Cancer**, v. 3, n. 1, p. 9, dez. 2017.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CARMENA, M. *et al.* The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 12, p. 789–803, dez. 2012.

CAVALCANTE, G. M. **ANÁLISE DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DO DNA DE PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA** Universidade Federal do Ceará. Dissertação. p. 74, 2020.

CAZZOLA, M; DELLA PORTA, M G.; MALCOVATI, L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. **Blood**, v. 122, n. 25, p. 4021–4034, 12 dez. 2013.

CHAMSEDDINE, A. N. *et al.* Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 1, p. 4, jan. 2016.

CHANG, Y. C. *et al.* Centrosomal Protein 55 (Cep55) Stability Is Negatively Regulated by p53 Protein through Polo-like Kinase 1 (Plk1). **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 6, p. 4376–4385, 3 fev. 2012.

CHEN, C.T; HEHNLY, H; DOXSEY, S J. Orchestrating vesicle transport, ESCRTs and kinase surveillance during abscission. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 8, p. 483–488, ago. 2012.

CHENG L. *et al.*, Cell Division Cycle Protein (CDC20), a Promising Prognostic Biomarker of Breast Cancer. **Bioscience Reports**, , p. BSR20191227, 14 abr. 2020.

CHI, J. J. *et al.* A novel strategy to block mitotic progression for targeted therapy. **EBioMedicine**, v. 49, p. 40–54, nov. 2019.

COREY, S.J.; MINDEN, M D.; BARBER, D L.; KANTARJIAN, H; WANG, J C. Y.; SCHIMMER, A D. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 2, p. 118–129, fev. 2007.

COSTA, M.B. **ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO DA LESÃO DE FITA SIMPLES DO DNA DE TRABALHADORES RURAIS EXPOSTOS A AGROTÓXICOS**. Universidade Federal do Ceará. Dissertação. p. 118, 2017.

COSTA, M. B. et al. It is not just the number of metaphases that matters. **Leukemia Research**, v. 68, p. 70–71, maio 2018.

DAVOLI, T; DE LANGE, T. The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 585–610, 10 nov. 2011.

DE CÁRCER, G. et al. Plk1 overexpression induces chromosomal instability and suppresses tumor development. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3012, dez. 2018.

DE MATOS, A. G. et al.. Interleukin-8 and nuclear factor kappa B are increased and positively correlated in myelodysplastic syndrome. **Medical Oncology**, v. 34, n. 10, p. 168, out. 2017.

DE OLIVEIRA, F M. et al. Differential expression of AURKA and AURKB genes in bone marrow stromal mesenchymal cells of myelodysplastic syndrome: correlation with G-banding analysis and FISH. **Experimental Hematology**, v. 41, n. 2, p. 198–208, fev. 2013.

DE OLIVEIRA, R.T.G. **ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS DNA POLIMERASES COM ATIVIDADE TRANSLESÃO EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA.**, Universidade Federal do Ceará. Dissertação. p. 113, 2018.

DIAZ-MORALLI, S. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 255–271, maio 2013.

DONAIRES, F. S. et al.. Splicing factor SF3B1 mutations and ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes: a Brazilian cohort screening study. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 4, p. 320–324, out. 2016.

DONNE, R. et al. Polyploidy in liver development, homeostasis and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 2 abr. 2020.

FABBRO, M. et al. Cdk1/Erk2- and Plk1-Dependent Phosphorylation of a Centrosome Protein, Cep55, Is Required for Its Recruitment to Midbody and Cytokinesis. **Developmental Cell**, v. 9, n. 4, p. 477–488, out. 2005.

FARIAS, I R. **ANALISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DE REPARO DA LESÃO DE FITA DUPLA DO DNA DE TRABALHADORES RURAIS EXPOSTOS A AGROTÓXICOS.** Universidade Federal do Ceará. Dissertação. p. 101, 2017.

FELD, J; BELASEN, A; NAVADA, S C. Myelodysplastic syndromes: a review of therapeutic progress over the past 10 years. **Expert Review of Anticancer Therapy**, p. 1–18, 1 jun. 2020.

FENAUX, P. et al. Luspatercept in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 2, p. 140–151, 9 jan. 2020.

FERREIRA FILHO, L I P. **Estudo das alterações citogenômicas da medula óssea de trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.** Universidade Federal do Ceará. Dissertação, p. 76, 2013.

FOURNIER, E. *et al.* Baseline dysmegakaryopoiesis in inherited thrombocytopenia/platelet disorder with predisposition to haematological malignancies. **British Journal of Haematology**, v. 189, n. 4, maio 2020.

FRANÇA, I. G. F. **PAPEL DAS POLIMERASES TLS COMO BIOMARCADORES DE EFEITO FRENTE A EXPOSIÇÃO CRÔNICA DE AGRICULTORES Á PESTICIDAS. HÁ EVIDÊNCIA NA SINDROME MIELODISPLÁSICA?** Universidade Federal do Ceará. Dissertação , p. 86, 2020.

FRANÇA, I. G. F. *et al.* Role of conventional cytogenetics in sequential karyotype analysis of myelodysplastic syndrome: a patient with der(1;7)(q10;p10). **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 41, n. 1, p. 91–94, jan. 2019.

GADJI, M; POZZO, A R. From cellular morphology to molecular and epigenetic anomalies of myelodysplastic syndromes. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 58, n. 7, p. 474–483, jul. 2019.

GARCIA-MANERO, G; CHIEN, K; MONTALBAN-BRAVO, G. Myelodysplastic Syndromes: 2021 update on Diagnosis, Risk-stratification and Management. *American Journal of Hematology*, , p. ajh.25950, 3 ago. 2020.

GEDDIS, A E. Megakaryopoiesis. **Seminars in Hematology**, v. 47, n. 3, p. 212–219, jul. 2010.

GENGA, K. R. *et al.* Proteins of the mitotic checkpoint and spindle are related to chromosomal instability and unfavourable prognosis in patients with myelodysplastic syndrome. **Journal of Clinical Pathology**, v. 68, n. 5, p. 381–387, maio 2015.

GHELLI LUSERNA DI RORÀ, A; MARTINELLI, G; SIMONETTI, G. The balance between mitotic death and mitotic slippage in acute leukemia: a new therapeutic window? **Journal of Hematology & Oncology**, v. 12, n. 1, p. 123, dez. 2019.

GREENBERG, P. L. *et al.* Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454–2465, 20 set. 2012.

GREENBERG, P. L. *et al.* Cytopenia levels for aiding establishment of the diagnosis of myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 128, n. 16, p. 2096–2097, 20 out. 2016.

HASSERJIAN, R P. Myelodysplastic Syndrome Updated. **Pathobiology**, v. 86, n. 1, p. 7–13,

HEALD, R. W. Burning the spindle at both ends. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 300–301, jan. 2004.

HEREDIA, F. F. *et al.* Aurora-B expression may not contribute to disease progression: a reflection of the heterogeneous pathogenesis? **Haematologica**, v. 97, n. 10, p. e37–e39, 1 out. 2012.

HEREDIA, F.F *et al.* Proteins related to the spindle and checkpoint mitotic emphasize the different pathogenesis of hypoplastic MDS. **Leukemia Research**, v. 38, n. 2, p. 218–224, fev. 2014.

HOLLAND, A. J.; CLEVELAND, D. W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 7, p. 478–487, jul. 2009.

IWAMORI, T. *et al.* TEX14 Interacts with CEP55 To Block Cell Abscission. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 9, p. 2280–2292, 1 maio 2010.

JEFFERY, J. *et al.* Beyond cytokinesis: the emerging roles of CEP55 in tumorigenesis. **Oncogene**, v. 35, n. 6, p. 683–690, fev. 2016.

KALIMUTHO, *et al.* CEP 55 is a determinant of cell fate during perturbed mitosis in breast cancer. **EMBO Molecular Medicine**, v. 10, n. 9, set. 2018.

KOMROKJI, R. S. Luspatercept in Myelodysplastic Syndromes. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 393–400, abr. 2020.

KUMAR, A. *et al.* CEP proteins: the knights of centrosome dynasty. **Protoplasma**, v. 250, n. 5, p. 965–983, out. 2013.

LARA-GONZALEZ, P; WESTHORPE, F.; TAYLOR, S S. The Spindle Assembly Checkpoint. **Current Biology**, v. 22, n. 22, p. R966–R980, nov. 2012.

LEE, J.; LIST, A.; SALLMAN, D. A. Molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes with deletion 5q. **European Journal of Haematology**, v. 102, n. 3, p. 203–209, mar. 2019.

LI, L. *et al.* β -Catenin Is a Candidate Therapeutic Target for Myeloid Neoplasms with del(5q). **Cancer Research**, v. 77, n. 15, p. 4116–4126, 1 ago. 2017.

LI, F. *et al.* CEP55 promoted the migration, invasion and neurosphere formation of the glioma cell line U251. **Neuroscience Letters**, v. 705, p. 80–86, jul. 2019.

LI, F. *et al.* CEP55 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis via the PI3K/Akt/p21 signaling pathway in human glioma U251 cells. **Oncology Letters**, 2 fev. 2018.

LI, J. *et al.* CDK1 and CDC20 overexpression in patients with colorectal cancer are associated with poor prognosis: evidence from integrated bioinformatics analysis. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 18, n. 1, p. 50, dez. 2020.

LI, M. *et al.* CEP55 Promotes Cell Motility via JAK2–STAT3–MMPs Cascade in Hepatocellular Carcinoma. **Cells**, v. 7, n. 8, p. 99, 8 ago. 2018.

LINDQVIST, A; RODRÍGUEZ-BRAVO, V; MEDEMA, R. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. **The Journal of Cell Biology**, v. 185, n. 2, p. 193–202, 20 abr. 2009.

LINDSLEY, R. C. Uncoding the genetic heterogeneity of myelodysplastic syndrome. **Hematology**, v. 2017, n. 1, p. 447–452, 8 dez. 2017.

- LIU, X. et al. PPM1K Regulates Hematopoiesis and Leukemogenesis through CDC20-Mediated Ubiquitination of MEIS1 and p21. **Cell Reports**, v. 23, n. 5, p. 1461–1475, maio 2018.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOK, T. et al. Mitotic slippage is determined by p31comet and the weakening of the spindle-assembly checkpoint. **Oncogene**, v. 39, n. 13, p. 2819–2834, mar. 2020.
- LUCA, M; LAVIA, P; GUARGUAGLINI, G. A Functional Interplay Between Aurora-A, Plk1 and TPX2 at Spindle Poles: Plk1 Controls Centrosomal Localization of Aurora-A and TPX2 Spindle Association. **Cell Cycle**, v. 5, n. 3, p. 296–303, fev. 2006.
- LUCENA-ARAUJO, A. R. *et al.* High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 35, n. 2, p. 260–264, fev. 2011.
- MAGALHÃES, S. M. M. *et al.* Guidelines on myelodysplastic syndromes: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40, n. 3, p. 255–261, jul. 2018.
- MALCOVATI, L. *et al.* Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: A basis for clinical decision making. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 30, p. 7594–7603, 2005.
- MALCOVATI, L. et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*. 2015;126(2):233-241.
- MALCOVATI, L. *et al.* SF3B1-mutant myelodysplastic syndrome as a distinct disease subtype - A Proposal of the International Working Group for the Prognosis of Myelodysplastic Syndromes (IWG-PM). **Blood**, , p. blood.2020004850, 29 abr. 2020.
- MATSUOKA, S. et al. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1160–1166, 25 maio 2007.
- MCBRIDE, A. et al. The Role of Inhibition of Apoptosis in Acute Leukemias and Myelodysplastic Syndrome. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 192, 27 mar. 2019.
- MCGOWAN-JORDAN, J. et al. ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016).
- MENDONÇA, P S.; PINHEIRO, R. F.; MAGALHÃES, S. M M. Myelodysplastic Syndrome Over Time. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 12, p. 2593–2594, dez. 2019.
- NAKAJIMA, H. Molecular Pathogenesis and Treatment of Myelodysplastic Syndromes. **Internal Medicine**, 2020.
- NAVADA, S. C. *et al.* Rigosertib in combination with azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukemia: Results of a phase 1 study. **Leukemia Research**, v. 94, p. 106369, jul. 2020.

- NETO, H.; GOULD, G. W. The regulation of abscission by multi-protein complexes. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 19, p. 3199–3207, 1 out. 2011.
- NOVAK, D. et al. SOX2 in development and cancer biology. **Seminars in Cancer Biology**, , p. S1044579X18301858, ago. 2019.
- OGAWA S. Genetics of MDS. **Blood**. 2019;133(10):1049-1059.
- OLUKOGA, T. et al. Another string to the polo bow: a new mitotic role of PLK1 in centromere protection. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 6, n. 6, p. 1658515, 2 nov. 2019.
- OKUBO, B. M. *et al.* Myelodysplastic syndrome patients present more severe respiratory muscle impairment and reduced forced vital capacity: Is disordered inflammatory signaling the culprit? **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184079, 6 set. 2017.
- OTTO, T; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93–115, fev. 2017.
- PAPAEMMANUIL, E. et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3616–3627, 21 nov. 2013.
- PERAZZIO, A; CHAUFFAILLE, M.L.L.F. When karyotype is decisive for myelodysplastic syndromes diagnosis. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 41, n. 4, p. 371–373, out. 2019.
- PETSALAKI, E; ZACHOS, G. DNA damage response proteins regulating mitotic cell division: double agents preserving genome stability. **The FEBS Journal**, v. 287, n. 9, p. 1700–1721, maio 2020.
- PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 11, p. 1110–1112, 2009.
- PINHEIRO, R. F. *et al.* The ambiguous role of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) immunoexpression in myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 33, n. 10, p. 1308–1312, out. 2009.
- PLATZBECKER, U. *et al.* Luspatercept for the treatment of anaemia in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes (PACE-MDS): a multicentre, open-label phase 2 dose-finding study with long-term extension study. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 10, p. 1338–1347, out. 2017.
- QI, J; LIU, G; WANG, F. High levels of centrosomal protein 55 expression is associated with poor clinical prognosis in patients with cervical cancer. **Oncology Letters**, 10 abr. 2018.
- RAAIJMAKERS, M.H.G.P. The MDS Niche: Inflammation Driving Bone Marrow Failure and Clonal Evolution. **HemaSphere**: June 2020 - Volume 4 - Issue S2 – p. 161.

RAVANDI, F. et al. Idarubicin, cytarabine, and nivolumab in patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia or high-risk myelodysplastic syndrome: a single-arm, phase 2 study. **The Lancet Haematology**, v. 6, n. 9, p. e480–e488, set. 2019.

RAVID, K. *et al.* Roads to polyploidy: The megakaryocyte example. **Journal of Cellular Physiology**, v. 190, n. 1, p. 7–20, jan. 2002.

RAZA, A; ALI, A; IVERSON, N. Developments in the treatment of transfusion-dependent anemia in patients with myelodysplastic syndromes: epidemiology, etiology, genetics, and targeted therapies. **Advances in Genomics and Genetics**, , p. 95, jul. 2014.

RAZA, A. *et al.* The biology of myelodysplastic syndromes: unity despite heterogeneity. **Hematology Reports**, v. 2, n. 1, p. 4, 23 jun. 2010.

RAZA, A; GALILI, N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 12, p. 849–859, dez. 2012.

RIBEIRO, H. L. R. Jr. *et al.* DNA repair gene expressions are related to bone marrow cellularity in myelodysplastic syndrome. **Journal of Clinical Pathology**, v. 70, n. 11, p. 970–980, nov. 2017.

RIBEIRO, H. L. R. Jr. *et al.* Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome: DNA repair genes in myelodysplastic syndrome. **Hematological Oncology**, v. 33, n. 4, p. 220–228, dez. 2015.

RIBEIRO, H. L. R. Jr. *et al.* Expression of DNA repair genes is important molecular findings in CD34 + stem cells of myelodysplastic syndrome. **European Journal of Haematology**, v. 100, n. 1, p. 108–109, jan. 2018.

RIBEIRO, H. L. R. Jr. *et al.* Can synthetic lethality approach be used with DNA repair genes for primary and secondary MDS? **Medical Oncology**, v. 36, n. 12, p. 99, dez. 2019.

RICHESON K, *et al.* Paradoxical mitotic exit induced by a small molecule inhibitor of APC/CCdc20. **Nature Chemical Biology**, 9 mar. 2020. DOI 10.1038/s41589-020-0495-z.

ROY L., *et al.* Asymmetrical segregation of chromosomes with a normal metaphase/anaphase checkpoint in polyploid megakaryocytes. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2238–2247, 15 abr. 2001.

SALLMAN, D. A. To target the untargetable: elucidation of synergy of APR-246 and azacitidine in *TP53* mutant myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 105, n. 6, p. 1470–1472, jun. 2020.

SALLMAN, D. A.; LIST, A. The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 133, n. 10, p. 1039–1048, 7 mar. 2019.

SANTIAGO, S. P. *et al.* New polymorphisms of Xeroderma Pigmentosum DNA repair genes in myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 58, p. 73–82, jul. 2017.

- SANTIBÁÑEZ-ANDRADE, M. *et al.* Airborne particulate matter induces mitotic slippage and chromosomal missegregation through disruption of the spindle assembly checkpoint (SAC). **Chemosphere**, v. 235, p. 794–804, nov. 2019.
- SANZ-GÓMEZ, N. *et al.* Squamous differentiation requires G2/mitosis slippage to avoid apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, 20 fev. 2020.
- SCALZULLI, E *et al.*. Therapeutic strategies in low and high-risk MDS: What does the future have to offer? **Blood Reviews**, , p. 100689, mar. 2020.
- SCHECTER, J; GALILI, N; RAZA, A. MDS: Refining existing therapy through improved biologic insights. **Blood Reviews**, v. 26, n. 2, p. 73–80, mar. 2012.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.
- SCHROCK, M. S. *et al.* APC/C ubiquitin ligase: Functions and mechanisms in tumorigenesis. **Seminars in Cancer Biology**, , p. S1044579X20300596, mar. 2020.
- SIMONETTI, G. *et al.* Aneuploidy: Cancer strength or vulnerability?: Aneuploidy: Cancer strength or vulnerability? **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 1, p. 8–25, 1 jan. 2019.
- SIMONETTI, G. *et al.* Aneuploid acute myeloid leukemia exhibits a signature of genomic alterations in the cell cycle and protein degradation machinery. **Cancer**, v. 125, n. 5, p. 712–725, mar. 2019.
- SINHA, D; DUIJF, P. H.G.; KHANNA, K. K. Mitotic slippage: an old tale with a new twist. **Cell Cycle**, v. 18, n. 1, p. 7–15, 2 jan. 2019.
- SINHA, *et al.* Cep55 overexpression causes male-specific sterility in mice by suppressing Foxo1 nuclear retention through sustained activation of PI3K/Akt signaling. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 9, p. 4984–4999, set. 2018.
- SINHA, *et al.* Cep55 overexpression promotes genomic instability and tumorigenesis in mice. preprint. **Cancer Biology**, 24 set. 2019. DOI 10.1101/780775. Disponível em:
- SOUSA, J C. *et al.* Dysregulation of interferon regulatory genes reinforces the concept of chronic immune response in myelodysplastic syndrome pathogenesis. **Hematological Oncology**, v. 37, n. 4, p. 523–526, out. 2019.
- STORCHOVA, Z; PELLMAN, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 1, p. 45–54, jan. 2004.
- TERHUNE, S. S. *et al.* Network mechanisms and dysfunction within an integrated computational model of progression through mitosis in the human cell cycle. **PLOS Computational Biology**, v. 16, n. 4, p. e1007733, 6 abr. 2020.
- TORMOS, A M.; TALÉNS-VISCONTI, R.; SASTRE, J. Regulation of cytokinesis and its clinical significance. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 52, n. 4, p. 159–167, 4 jul. 2015.

TRAKALA, M. *et al.* Functional Reprogramming of Polyploidization in Megakaryocytes. **Developmental Cell**, v. 32, n. 2, p. 155–167, jan. 2015.

VANDESOMPELE, J., et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 2002;3(7).

VANGENDEREN, C.; HARKNESS, T A A; ARNASON, T G. The role of Anaphase Promoting Complex activation, inhibition and substrates in cancer development and progression. **Ageing**, v. 12, n. 15, p. 15818–15855, 15 ago. 2020.

VASSALLO, J. & MAGALHAES, S. M. M. **Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas.** *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009, vol.31, n.4, pp.267-272. ISSN 1806-0870.

VISCONTI, R; DELLA MONICA, R; GRIECO, D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 153, dez. 2016.

VITORIANO, B F. **AVALIAÇÃO IMUNOMOLECULAR E ATIVAÇÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA.** Universidade Federal do Ceará. Dissertação, p. 107, 2019.

WAN, T. S.K. **Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols.** Vol 1. 2016.

WANG, L. et al. Targeting Cdc20 as a novel cancer therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 151, p. 141–151, jul. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.04.002>.

WINTER, S. *et al.*. Integrating the “Immunome” in the Stratification of Myelodysplastic Syndromes and Future Clinical Trial Design. **Journal of Clinical Oncology**, , p. JCO.19.01823, 14 fev. 2020.

YAGI, M.; ROTH, G. J. Megakaryocyte polyploidization is associated with decreased expression of polo-like kinase (PLK). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 9, p. 2028–2034, set. 2006.

ZEDDIES, S. et al. MEIS1 regulates early erythroid and megakaryocytic cell fate. **Haematologica**, v. 99, n. 10, p. 1555–1564, 1 out. 2014.

ZENG, X. et al. Imbalance of the spindle-assembly checkpoint promotes spindle poison-mediated cytotoxicity with distinct kinetics. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 4, p. 314, abr. 2019.

ZHANG, Q. et al. Cell division cycle 20 (CDC20) drives prostate cancer progression via stabilization of β -catenin in cancer stem-like cells. **EBioMedicine**, v. 42, p. 397–407, abr. 2019.

ZHAO, Y et al. Downregulation of p21 in Myelodysplastic Syndrome Is Associated With p73 Promoter Hypermethylation and Indicates Poor Prognosis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 140, n. 6, p. 819–827, 1 dez. 2013.

ZIMMET, J; RAVID, K. Polyploidy: Occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. **Experimental Hematology**, , p. 14, 2000.



Apêndice A: Termo de consentimento livre e esclarecido.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO:

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES CDC20 E CEP55 EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar.

O abaixo assinado, _____

_____, ____ anos, RG nº _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro/Mayara Magna de Lima Melo. O abaixo assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é analisar os níveis de expressão dos genes CDC20 e CEP55 em pacientes com diagnóstico de SMD, associando os achados com alterações citogenéticas, variáveis clínicas, variáveis laboratoriais, prognóstico e sobrevida desses pacientes. Para compreender melhor os pontos clínicos dos pacientes visualizados nesta pesquisa, precisamos comparar os achados clínicos destes pacientes com indivíduos sadios (voluntários). É devido a este contexto que necessitamos recrutar indivíduos saudáveis (voluntários) para participar da presente pesquisa.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea do indivíduo. A medula óssea corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos ossos, sendo conhecida popularmente por 'tutano'. Na medula óssea são produzidos os

componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas.

A coleta da medula óssea será realizada por médico hematologista experiente com agulha de mielograma mediante punção esternal. O osso do esterno é um osso chato, plano e ímpar localizado no centro do tórax. O osso do esterno é um importante osso hematopoético, ou seja, de produção das células sanguíneas. É neste osso que é realizada a punção da medula óssea.

Serão coletadas somente 2mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos.

Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadada) ao redor do local de onde foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A recoleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade.

É de sua responsabilidade: comparecer nas datas e horários informados e submeter-se aos procedimentos de rotina do serviço.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador responsável ou a qualquer um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nesta instituição.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

O Laboratório de Citogenômica do Câncer o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. Você não será identificado por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, ou autoridades do(s) órgãos(s) regulamentar(es) envolvido(s) terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, como o propósito de verificar os procedimentos e dados do estudo, sem, no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais.

CONTATOS E PERGUNTAS

Poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará - UFC ou no local (Rua Coronel Nunes de Melo, 1000) ou pelo telefone 3366-8344, para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Somente assine este termo se você tiver a certeza de que recebeu todos os esclarecimentos e informações para decidir conscientemente sobre a sua participação neste estudo.

ASSINATURAS

Autorizo o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe de pesquisadores, nas condições estabelecidas descritas nos itens acima.

Não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Eu, por fim, declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** e que, após a assinatura, tive oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e também sobre o referido estudo, recebendo explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmando estar livre e espontaneamente decidido a participar do estudo, ficando munido de uma via do documento assinado pelo pesquisador responsável.

____/____/____

Data

Assinatura do participante da pesquisa

____/____/____

Data

Assinatura do Pesquisador Responsável

____/____/____

Data

Assinatura do Responsável pela aplicação do TCLE